

ULTRAMIKRO - GLASELEKTRODEN
MIT SELEKTIVER KATIONEN - EMPFINDLICHKEIT

WOLFHART FRIEDRICH VON STACKELBERG

1970

Aus dem Physiologischen Institut der Universität
München

Direktoren: Prof. Dr. K. Kramer
Prof. Dr. K. Thurau

ULTRAMIKRO - GLASELEKTRODEN

MIT SELEKTIVER KATIONEN - EMPFINDLICHKEIT

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Wolfhart Friedrich v. Stackelberg

München 1970



1. Referent: Prof. Dr. H. Autrum

2. Referent: Prof. Dr. K. Thureau

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 1970

Meinem Vater

I N H A L T

	Seite
Übersicht	5
Einführung	6
Beschreibung der Elektrode	9
Herstellung der Elektrode	11
Eigenschaften der Mikro-Kapillar-Elektroden	
Meßanordnung	18
pH - Elektroden	19
Na - Elektroden	23
K - Elektroden	32
Referenzelektroden	38
Erreichbare Meßgenauigkeit	39
Vorzüge dieser Elektrodenanordnung	46
Andere Elektrodenformen	49
Ansprechgeschwindigkeit der Glaselektroden	56
Anwendungsbeispiele	59
Literatur	66
Lebenslauf	70

Übersicht

Im Rahmen physiologischer Forschung besteht großes Interesse an zuverlässigen Mikromethoden zur Bestimmung des pH-Wertes, sowie der Natrium- und Kaliumkonzentrationen. In der vorliegenden Arbeit wird eine neue, selektiv kationen-empfindliche Ultramikro-Glaselektrode beschrieben, die im Bereich weniger Zehntel Nanoliter verwendet werden kann.

Einführung

Der Münchener Akademiker JOHANN WILHELM RITTER [44] gebrauchte im Jahre 1802 in einer „Volta'sischen Säule“ dünnwandige, auf beiden Seiten befeuchtete Gläser erstmals als elektrolytische Leiter. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde die Leitfähigkeit von Gläsern vielfach untersucht. Doch erst die in den Jahren 1905/1906 im Physiologischen Institut der Universität München von MAX CREMER [7] durchgeführten Experimente erbrachten die Erkenntnis, daß an beidseits von Lösungen benetzten Glasflächen elektrische Spannungen beobachtet werden können, die eine Funktion des unterschiedlichen Säuregrades dieser Lösungen sind. Die auf diese Entdeckung zurückzuführenden Glaselektroden haben sich heute als elegante, sehr genaue und einfach durchzuführende Methode zur pH-Wert-Bestimmung allgemein durchgesetzt.

HABER und KLEMENSIEWICZ [16] untersuchten 1909 die Gesetzmäßigkeiten dieser Potentialdifferenzen an Glasmembranen genauer. Die Arbeiten von HOROVITZ [21, 22], LENGYEL und BLUM [32], sowie zahlreicher weiterer Autoren führten zur Erklärung des sogenannten Alkalifehlers und zur Entwicklung von Glaselektroden mit selektiver Kationenempfindlichkeit. In besonderem Maße hat EISENMAN [9, 10] gründliche systematische Arbeiten hierüber durchgeführt und dadurch die Kenntnis der Theorie und Anwendungsmöglichkeit dieser Glaselektroden außerordentlich erweitert.

In der 1967 erschienenen umfangreichen Monographie von G. EISENMAN [10] „Glass Electrodes for Hydrogen and other Cations“ sind nahezu alle wichtigen einschlägigen Arbeiten bis zu diesem Zeitpunkt berücksichtigt. Hinsichtlich

der komplizierten Theorie des Zustandekommens der Elektrodenfunktion der verschiedenen Glassorten sei deshalb auf diese grundlegende Monographie verwiesen.

Bedingt durch das besondere diesbezügliche Interesse der biologischen Forschung lag die Entwicklung der verschiedenen Mikro-Ausführungen der Glaselektrode meist in den Händen von Biologen und Physiologen. Die Vielzahl dieser Mikro-Glaselektroden für Wasserstoff und andere Kationen läßt sich in zwei (in der Literatur leider nicht einheitlich bezeichnete) Gruppen einteilen:

1) Elektroden, deren empfindlicher Glasteil zu einer Kapillare ausgebildet ist, die mit der Meßflüssigkeit gefüllt wird - im Folgenden Kapillar-Elektroden genannt -,

2) Elektroden, deren äußerste, geschlossene Spitze aus einer sensitiven Glasmembran besteht (Spitzen-Elektroden).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte und in ihren Eigenschaften untersuchte Elektrode gehört zur ersten Gruppe. Die Zusammenstellung in Tabelle 1 zeigt, in welchen Stufen die Miniaturisierung dieser Kapillar-Elektroden für pH, Na^+ und K^+ seit 1929 gelang.

Tabelle 1

Entwicklung der Mikro-Glaselektrode für kleine Lösungsmengen		
pH-Elektroden		
Jahr	Verfasser	Lösungsbedarf der Elektroden
1929	MacInnes, Dole [34]	140 Mikroliter
1930	Fosbinder, Schoonover ^[11]	50 "
1931	Youden, Dobroscky[53]	10 "
1951	Ingold [23]	1 "
1954	Caldwell [3]	500 Nanoliter
1967	Khuri, Agulian, Oelert Harik ^[28]	50 "
1968	Khuri, Agulian, Harik ^[29]	10 "
1968	Uhlich, Baldamus, Ullrich [49]	2 "
Natrium- und Kalium-Glaselektroden		
1968	Khuri, Agulian, Harik ^[29]	10 Nanoliter

Beschreibung der Elektrode

Abb.1 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Kapillarelektrode, die Messungen in Lösungsmengen von etwa 0,1 Nanolitern gestattet.

Eine Kapillare aus selektiv kationenempfindlicher Glassorte von nur wenigen μ Durchmesser endet frei im Innern einer zwiebelförmig aufgeblasenen, 1 - 2 mm starken Kapillare aus gewöhnlichem Laborglas, durchläuft dann einen mit Bezugslösung gefüllten Teil und tritt schließlich an der Spitze des äußeren Schaftglases ins Freie aus. Im Innern des luftdicht verschlossenen Schaftglases sorgen Silicagelkörner für die Aufrechterhaltung extrem guter elektrischer Isolation. In den mit Bezugslösung gefüllten Teil taucht ein chlorierter Silberdraht. Die Elektrodenart wird durch die jeweilige Glassorte der Mikrokapillare bestimmt. Für pH-Elektroden besteht die Bezugslösung aus 0,1 n HCl, für Na-Elektroden aus 0,1 n NaCl und für K-Elektroden aus 0,1 n KCl.

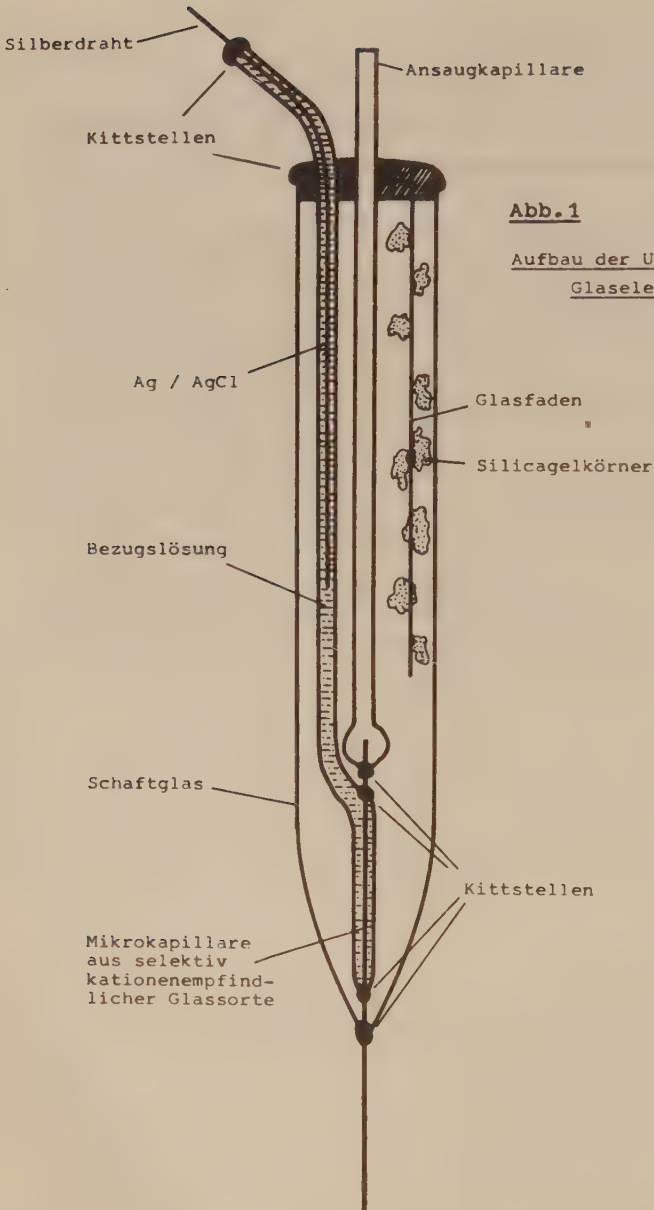


Abb. 1

Aufbau der Ultramikro-
Glaselektroden

Herstellung der Elektrode

Die von KHURI et al. [29] und UHLICH et al. [49] beschriebenen und bisher kleinsten Kapillar-Elektroden enthalten Glas-Verschmelzungen der empfindlichen mit den unempfindlichen Elektrodenteilen. Derartige Glaselektroden zeichnen sich durch Zuverlässigkeit und hohe Lebensdauer aus. Die Herstellung dieser Elektroden erfordert jedoch sehr viel Übung und dürfte in noch kleineren Abmessungen als den von KHURI und UHLICH erreichten technisch kaum möglich sein.

Diese Schwierigkeit läßt sich umgehen, wenn unter Verzicht auf Glas-Verschmelzungen die Kapillaren aus selektiv empfindlicher Glassorte in einem eigenen Arbeitsgang zunächst in den gewünschten Abmessungen hergestellt und dann in die Elektrode eingekittet werden.

Da die meisten selektiv kationenempfindlichen Glassorten sehr kostspielig sind und nur in kleinen Mengen und kleinen Abmessungen erhalten werden können, mußte für die Herstellung der Mikrokapillaren ein eigenes Verfahren entwickelt werden. Am besten bewährte sich die folgende Methode (Abb. 2):

Ein etwa 5 - 10 mm langes Stück sensitiver, 1 - 2 mm starker Glaskapillare wurde beidseits mit einer etwa 10 cm langen nichtsensitiven Glassorte von etwas höherem Schmelzpunkt verschmolzen und in ein 5 cm langes V2A - Rohr mit einem Durchmesser von etwa 1 cm gebracht. Das Rohr wurde von außen mit einer Bunsenflamme erhitzt. Sobald der sensitive Glasteil bis zum Schmelzpunkt erhitzt war, ließ er sich frei Hand zu sehr gleichmäßigen Kapillaren von wenigen μ Durchmesser und über ein Meter Länge ausziehen. Da für eine einzelne Kapillar-Elektrode nur 5 - 10 mm sensitiver Mikrokapillare benötigt werden, läßt sich auf diese Weise aus den vorhandenen Ausgangsgläsern eine Maximalzahl von Elektroden herstellen. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens be-

steht darin, daß der sensitive Teil des Glases nicht direkt der Flamme ausgesetzt wird und auch nicht länger erhitzt wird, als notwendig. Die volle Elektrodenfunktion der Gläser kann so erhalten bleiben.

Die Methode gestattet grundsätzlich die Herstellung auch noch wesentlich feinerer, durchgängiger Kapillaren bis zu einem Durchmesser, der unterhalb des Auslösungsvermögens des Lichtmikroskopes liegt. Für die hier vorliegenden Aufgabenstellung war jedoch ein Mindestdurchmesser von etwa $3\text{ }\mu$ erforderlich.

Die weiteren Arbeitsgänge der Elektrodenherstellung sind schematisch in Abb. 3 dargestellt. Alle Glasteile wurden mit Alkohol gereinigt und bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Ein $5 - 10\text{ mm}$ langes Stück sensitiver Mikrokapillare wurde dann in das zur Zwiebelform aufgeblasene Stück der Ansaugkapillare frei endend eingekittet. Als Kitt hat sich UHU plus gut bewährt, der bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgehärtet und dann mit einer Paraffinschicht überzogen wurde. Siegellack erwies sich wegen seiner Neigung zur Ausbildung feiner Sprünge als ganz ungeeignet. Die Kittstelle muß aus Gründen der Isolation möglichst klein gehalten werden. Als Material der Ansaugkapillare wurden verschiedene hochisolierende Laborglassorten verwendet. Glaskapillaren von wenigen μ Durchmesser sind hinreichend flexibel, um etwas gekrümmt eingekittet werden zu können. Unterschiedliche thermische Ausdehnungskoeffizienten der einzelnen Glassorten lassen sich auf diese Weise leicht ausgleichen.

Die für die Aufnahme der Bezugslösung bestimmte Kapillare wird in der in Abb. 3 B dargestellten Form über einer Mikroflamme gebogen, zu feinen Spitzen ausgezogen und im vordersten Teil zugeschmolzen (Abb. 3 C). Nach Anschluß an eine Druckluftleitung wird über der Mikroflamme am rückwärtigen Knie der Kapillare ein etwa $50\text{ }\mu$ großes Loch geblasen (Abb. 3 D). Danach wird der zugeschmolzene Teil der vordersten Spitze wieder aufgebrochen, Teil A durch die so entstandenen Öffnungen geschoben und beide Kapil-

laren starr miteinander verbunden durch einen schnell härtenden Klebstoff (z.B. X 60 der Firma HOTTINGER - BALDWIN). Die Eintritts- und Austrittsstelle der sensitiven Mikrokapillare im Bezugslösungsteil wird ebenfalls mit UHU plus verkittet, bei 100 °C ausgehärtet und mit Paraffin überzogen. Der gesamte Teil E wird dann gemeinsam mit den Silicagelkörnern in das zu einer feinen Spitze ausgezogene Schaftglas eingebracht und das Schaftglas luftdicht mit X 60, UHU plus und zuletzt noch mit einem Lacküberzug verschlossen.

Die Kittstellen an der Mikrokapillare müssen deutlich voneinander abgesetzt sein, da sich sonst zwischen Glas und Kitt ein durchgängiger Flüssigkeitsfilm ausbilden kann, der die Elektrode schließlich unbrauchbar machen würde. Liegt zwischen den Kittstellen ein nicht mit UHU plus überzogener Teil, so verhindern die Silicagelkörner zuverlässig die Ausbildung eines solchen Fehlerfilmes. Die Silicagelkörner sind ihrerseits auf einem Glasfaden festgekittet, da bei lose beweglichen Körnern beim Gebrauch der Elektrode die Gefahr einer mechanischen Beschädigung der Mikrokapillare gegeben wäre.

In diesem Zustand sind die Kapillarelektroden an staubfreiem Ort praktisch unbegrenzt lagerfähig. Vor Gebrauch wird die Bezugslösungs-Kapillare mit Hilfe eines dünnen Plastikschauches mit der jeweiligen Bezugslösung luftblasenfrei gefüllt, was sich sehr leicht durchführen läßt. Zuletzt wird der chlorierte Silberdraht eingekittet.

Bevor Glaselektroden für Messungen verwendet werden können, müssen sie erst gewässert werden zur Ausbildung der die Elektrodenfunktion bewirkenden Glas-Quellschicht. Über die erforderliche Wässerungszeit von Mikro-Glaselektroden finden sich in der Literatur die unterschiedlichsten Angaben. SCHWABE [47] hält für Glasmembranen von weniger als 10 µ Dicke einige Stunden für ausreichend, UHLICH et al. [49] wässerten ihre Elektroden 7 - 10 Tage, RECTOR et al. [43] 2 Wochen. KHURI [26] nennt für Mikro-Na-Elektroden eine

Wässerungszeit von einigen Tagen, während seine K-Elektroden etwas längere Zeit gewässert wurden. EISENMAN [9, 10] weist darauf hin, daß K-Glaselektroden ihre volle Selektivität erst nach jahrelanger Wässerung zeigten.

Diese unterschiedlichen Angaben machen deutlich, daß offenbar nicht nur die Stärke der Glasmembran und die Zusammensetzung der zur Wässerung verwendeten Lösung, sondern auch die jeweilige Glassorte für die erforderliche Wässerungszeit ausschlaggebend ist.

Die für die hier beschriebene Elektrodenform durchgeführten Untersuchungen der erforderlichen Wässerungszeit ergaben dementsprechend für die einzelnen selektiven Glassorten auch unterschiedliche Ergebnisse:

Na-Kapillar-Elektroden der in Abb.1 dargestellten Form erwiesen sich fast immer sofort nach Füllung des Bezugslösungsteiles als meßbereit. Bei voller Elektrodensteilheit war die Funktion dann schon konstant und reproduzierbar. Eine Wässerungszeit von wenigen Minuten war also ausreichend. Diese erstaunlich kurze Wässerungszeit kann daher rühren, daß die sensitiven Mikrokapillaren meist schon Tage oder Wochen vor ihrem Einbau in die Elektroden hergestellt worden waren und infolgedessen sich bei der vorhandenen Luftfeuchtigkeit möglicherweise „selbst“ gewässert haben.

K-Elektroden zeigen auch sofort nach Füllung eine Elektrodenfunktion, doch war deren Konstanz und Reproduzierbarkeit nur bei den Elektroden bis zur Größenordnung von etwa 100 Nanoliter dann auch gleich zufriedenstellend. Die Selektivität K/Na ist in den ersten Wochen mit Sicherheit nicht konstant. Die entsprechenden Angaben von EISENMAN [9] konnten also bestätigt werden.

pH-Elektroden zeigen ebenfalls sofort nach ihrer Fertigstellung die volle Elektrodenfunktion. Infolge der Alkali-

abgabe der Gläser neigen diese Elektroden in den ersten Tagen jedoch zur Ausbildung einer „Trift“ in der Elektrodenspannung. Stark gepufferte Lösungen können schon nach wenigen Stunden Wässerungszeit mit konstanter und reproduzierbarer Elektrodenspannung gemessen werden, schwach gepufferte dagegen erst nach einer Wässerungszeit von einigen Tagen. pH - Elektroden aus MacInnes-Glas (CORNING 015) müssen relativ lang gewässert werden (3 - 4 Tage), für das Titanoxyd haltige Glas der Firma INGOLD genügten meist 1 - 2 Tage.

Grundsätzlich läßt sich die Wässerungszeit abkürzen, wenn die zu messende Ionenart in der Wässerungslösung reichlich vorhanden ist, wenn also pH-Elektroden in 1/10 n HCl, Na-Elektroden in 1/10 n NaCl und K-Elektroden in 1/10 n KCl gewässert werden. Diese Lösungen, insbesondere 1/10 n HCl, greifen die dünnen Glasmembranen jedoch stark an und verkürzen die Lebensdauer der Mikroelektroden. Für den jeweiligen Anwendungsfall muß also ein Kompromiß geschlossen werden.

Wichtig zur Erzielung kurzer Wässerungszeiten ist es auch, die für den Spannungsabgriff bestimmten chlorierten Silberdrähte vorher nicht trocken zu lagern. Bis zur Annahme eines konstanten Potentials können sonst viele Stunden vergehen (KORDATZKI [30]).

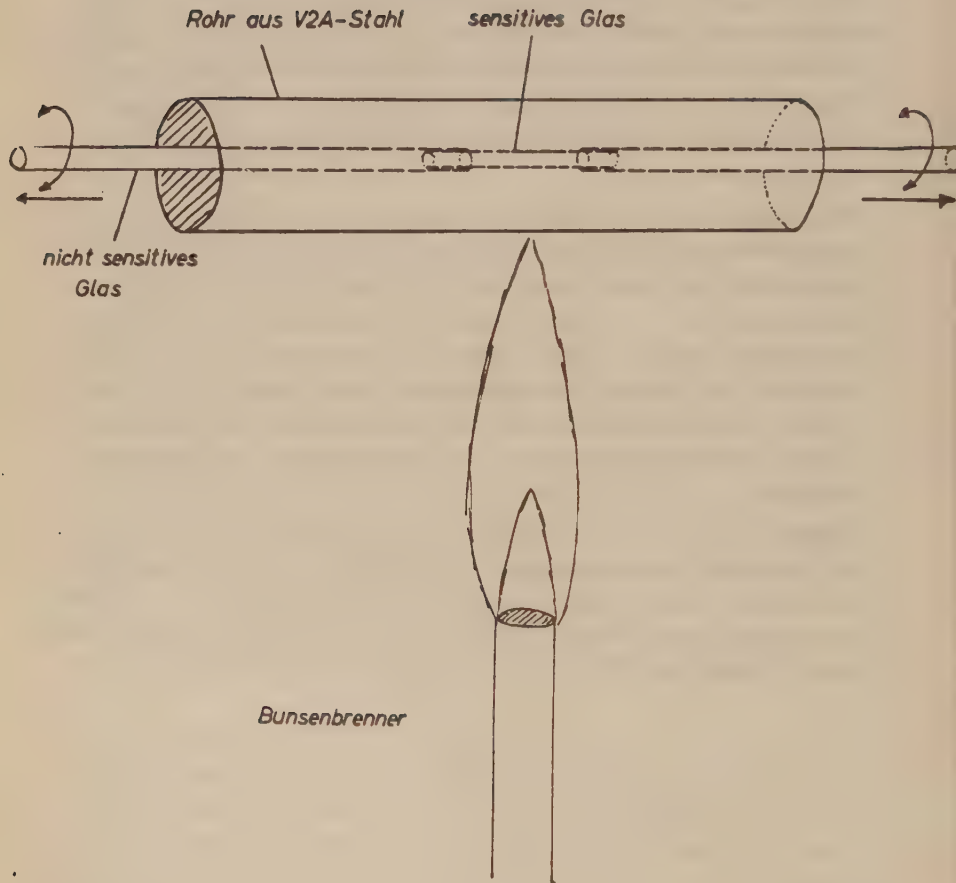


Abb. 2

Herstellung der Mikro-Kapillaren aus
sensitivem Glas

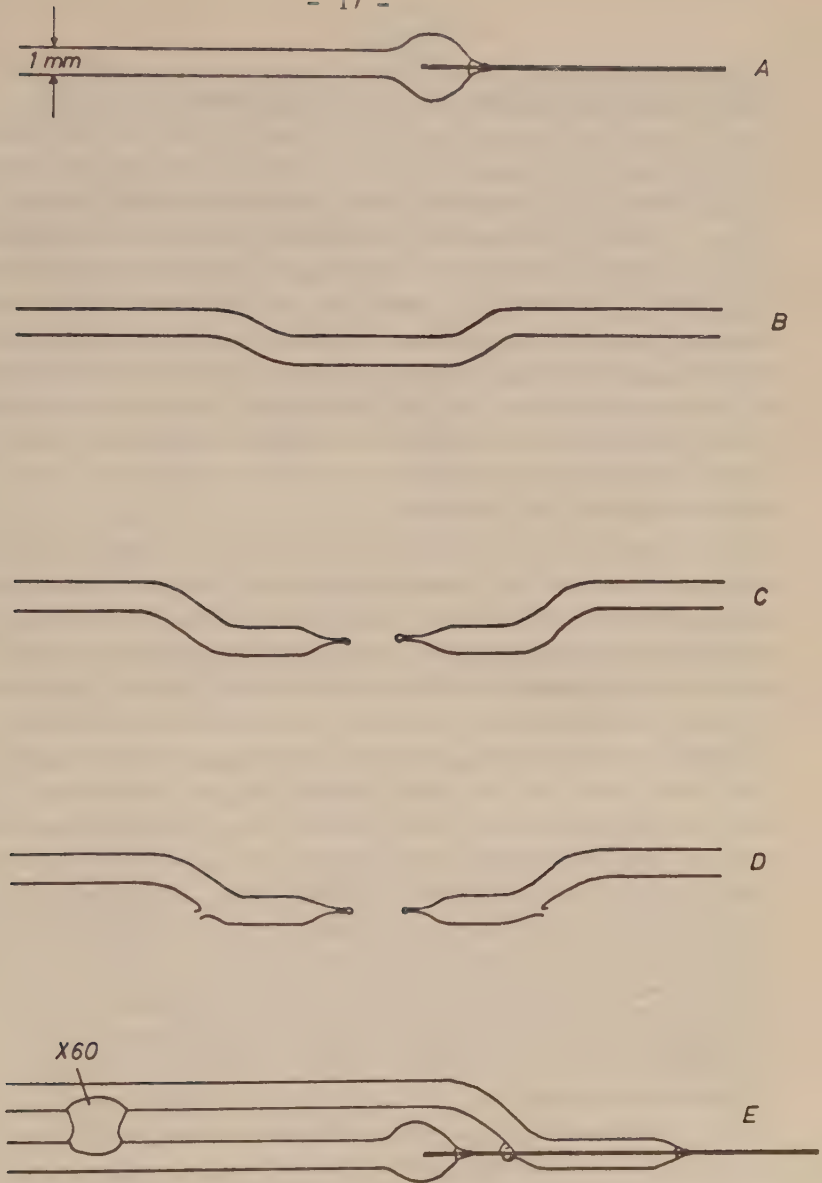


Abb. 3

Konstruktion der Innenteile der Kapillar-Mikroelektroden

Eigenschaften der Mikro-Kapillar-Elektroden

Die Wandstärke der sensitiven Glaskapillaren der hier beschriebenen Glaselektroden liegt meist erheblich unter $0,5 \mu$. SCHWABE [47] schätzt die Dicke der sich auf jeder Seite der Elektrodengläser bildenden Quellschichten auf $50 - 500 \text{ \AA}$. EISENMAN [9] nennt für K-Elektroden sogar Quellschichtstärken von über $10\,000 \text{ \AA}$. Somit ist die Dicke der Quellschichten nicht mehr a priori vernachlässigbar klein verglichen mit der Wandstärke der Kapillare. Aus diesem Grund wäre es unzulässig, sich auf die Gültigkeit der bei Makroelektroden bekannten Eigenschaften auch bei Mikroelektroden zu verlassen.

Abb.4 zeigt die Versuchsanordnung, mit deren Hilfe die Eigenschaften und der Anwendungsbereich der verschiedenen Mikroelektroden untersucht wurde. Die gesamte Anordnung befand sich in einem elektrostatischen Abschirmkäfig. Die Spannungszuführung zur Eingangsbuchse des Meßverstärkers erfolgte kabelfrei über einen im Innern eines Messingrohres befindlichen Draht, der mit dem chlorierten Silberdraht der Elektrode verlötet wurde. Zur Isolation zwischen Messingrohr und Draht wurde Quarzglas und Teflon verwendet. Der Meßverstärker (meist KNICK 34, gelegentlich auch KNICK 29, KEITHLEY 603 oder KEITHLEY 640) befand sich in einem zusätzlichen Plexiglasgehäuse, dessen Innenraum mit Hilfe von Silicagel extrem trocken gehalten werden konnte zur Aufrechterhaltung des vollen Eingangswiderstandes der Geräte ($10^{14} - 10^{16} \text{ Ohm}$). Je nach Abmessungen und Wasserungszustand der Mikrokapillare muß mit einem Elektrodenwiderstand von $10^9 - 10^{12} \text{ Ohm}$ gerechnet werden. Elektrodenwiderstände in dieser Größenordnung werden von allen Verfassern von Arbeiten über Mikroelektroden genannt [5, 18, 19, 20, 25, 43, 49, 51].

Für die Messung wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators im Blickfeld eines Mikroskops die Spitze der Kapillarelektrode in dem unter Paraffinöl befindlichen Mikrotropfen lokalisiert und die Kapillare danach mit der Meßflüssigkeit gefüllt. Mit einem zweiten Mikromanipulator wurde dann die Spitze der Referenzelektrode mit dem restlichen Tropfen in Berührung gebracht. Zur Beleuchtung wurden ausschließlich Glasfaser verwendet, so daß im Innern des Abschirmkäfigs keine Geräte mit Netzanschluß erforderlich waren. Referenzelektrode, Abschirmgehäuse und Meßverstärkergehäuse waren gemeinsam geerdet.

pH - Elektroden

Von allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten sensitiven Glassorten ließen sich die pH-Gläser, vorallem auch auf Grund ihres niedrigen Schmelzpunktes, am leichtesten bearbeiten. Verwendet wurden die pH-Gläser

CORNING 0150 (McINNES - Glas)

SCHOTT U-64

INGOLD Titanglas

Von diesen pH-sensitiven Gläsern ist das CORNING 0150-Glas am bekanntesten. Es hat sich seit Jahrzehnten bewährt. Nach Angaben der CORNING Glass Works, N.Y., (zitiert bei KHURI [29]), hat dieses Glas einen Erweichungspunkt von 655°C und einen thermischen Ausdehnungskoeffizienten von $110 \cdot 10^{-7} \text{ grad}^{-1}$. Seine Zusammensetzung ist nach SCHWABE [47] und KORDATZKI [30]:

72 %	SiO_2
6 %	CaO
22 %	Na_2O

Dieses Glas ist leicht schmelzbar, läßt sich gut bearbeiten, hat einen geringen elektrischen Widerstand - ist aber leider chemisch stark angreifbar. Es ist preisgünstig im Handel in großen Mengen erhältlich, so daß die Herstellung

der pH-Mikroelektroden durch die Möglichkeit relativ großzügigen Verbrauchs an sensitivem Glas sehr erleichtert wird. Durch freundliches Entgegenkommen der Firma INGOLD stand auch eine genügende Menge des Titanoxyd-haltigen, pH-sensitiven Glases zur Verfügung, so daß auch aus dieser Glassorte eine große Zahl Mikro-Glaselektroden gefertigt werden konnten.

Die Eigenschaften der fertiggestellten pH-Mikroelektroden wurden getestet, indem die Elektroden abwechselnd mit Puffer-Lösungen bekannten pH-Wertes gefüllt wurden. Ein Schreibgerät zeichnete die Spannungsanzeige des Meßverstärkers auf, so daß anhand des Registrierstreifens dann leicht Aussagen über die Konstanz und Reproduzierbarkeit der Elektrodenfunktion gemacht werden konnten. Alle hier untersuchten pH-Glassorten erwiesen sich als geeignet für die Konstruktion von Mikro-Kapillar-Elektroden. Die Elektrodensteilheit (mV/pH-Einheit) erreichte meist den theoretisch zu erwartenden Wert (z.B. 59,16 mV bei 25 °C) oder lag nur wenige mV darunter.

Die Temperaturkonstanz während aller Messungen mit Mikro-Glaselektroden ist für die Meßgenauigkeit von ausschlaggebender Bedeutung. Temperaturschwankungen beeinflussen nicht nur die Elektrodensteilheit, sondern alle in der gesamten Meßkette vorhandenen Potentiale. Schon Temperaturschwankungen von wenigen °C können erhebliche Meßfehler verursachen, insbesondere bei asymmetrischen Meßketten. Dies gilt besonders, wenn die Temperaturänderung nur einen Teil der gesamten Meßanordnung betrifft. Die Verwendung von Temperaturkorrekturfaktoren ist erfahrungsgemäß eine zu ungenaue Methode. Das Problem läßt sich am besten dadurch umgehen, daß Eichung und Messung bei derselben Temperatur vorgenommen werden. Abb.5 zeigt das Verhalten einer Mikro-pH-Elektrode bei Temperaturerhöhung von 25 °C auf 37 °C. (Auf dem Diagrammpapier dieser und entsprechender Abbildungen ist jeweils die reine Registrierzeit angegeben. Bei jedem Lösungswechsel war der Schreiber etwa 30 sec ausgeschaltet.)

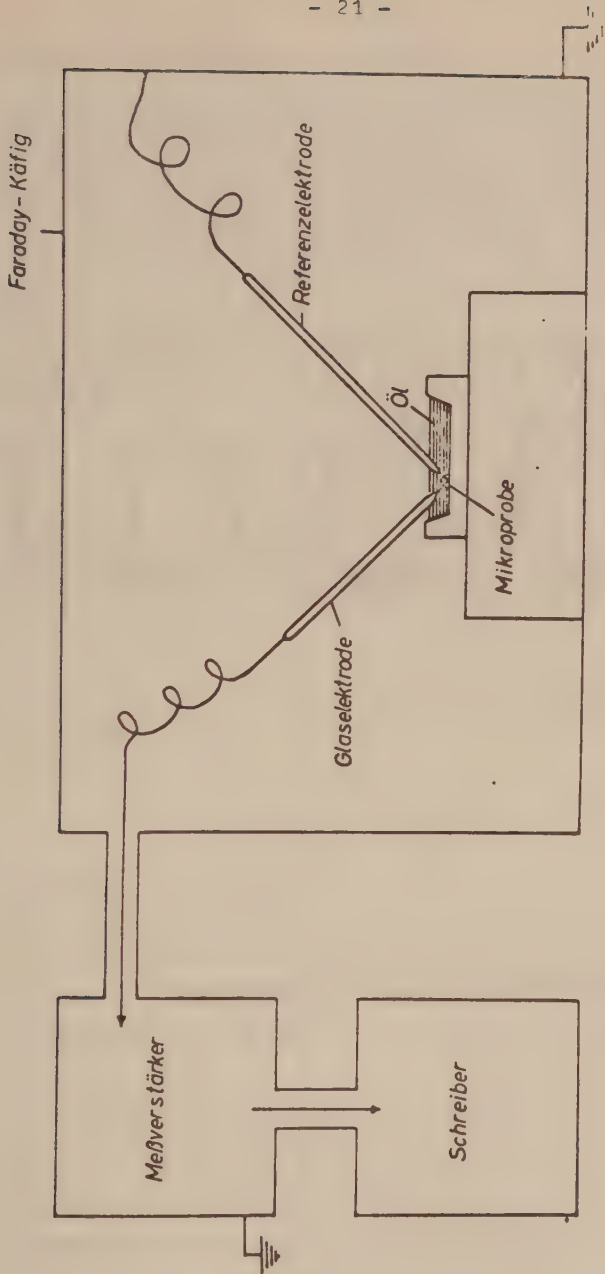


Abb. 4

Schematische Darstellung der Meßanordnung

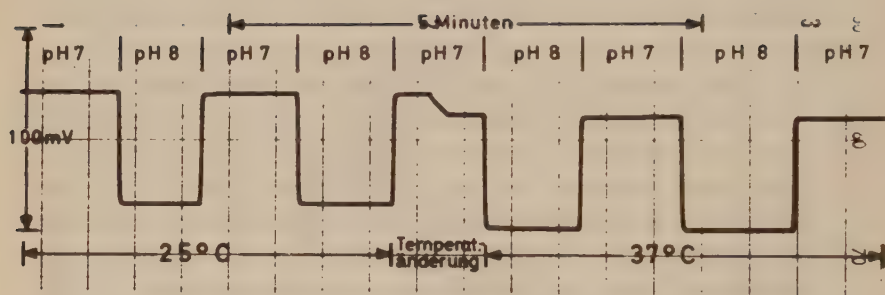


Abb.5

Temperaturfunktion einer Mikro-pH-Elektrode

(Eigenbau pH 63, CORNING 0150 - Glas, Referenzelektrode konstant auf 25 °C)

Natrium-Elektroden

Abgesehen von der Art der sensitiven Glassorte gleicht der Aufbau der Na-Mikroelektroden demjenigen der pH - Elektroden, nur daß statt 0,1 n HCl als Bezugslösung 0,1 n NaCl verwendet wurde. Folgende Na-sensitiven Glassorten standen zur Verfügung:

CORNING NAS 11-18

SCHOTT pNa-HM 3397

INGOLD pNa 27-8

INGOLD XX/14

Ferner je eine nicht näher bezeichnete Glasprobe von SCHOTT und INGOLD. Einige Vergleichsmessungen wurden mit im Handel bezogenen Makro-Na-Glaselektroden der Firmen SCHOTT und INGOLD durchgeführt. Die einzelnen Na - sensitiven Glassorten unterscheiden sich in mancher Hinsicht stark voneinander.

Die bekannteste der hier untersuchten Na - sensitiven Glassorten, CORNING NAS 11-18, setzt sich folgendermaßen zusammen (EISENMAN [9]):

11 mol % Na_2O

18 mol % Al_2O_3

71 mol % SiO_2

Der Erweichungspunkt liegt nach Angaben der CORNING Glass Works, N.Y., (mitgeteilt bei KHURI [29]), oberhalb 970°C , der Ausdehnungskoeffizient ist $53 \cdot 10^{-7} \cdot \text{grad}^{-1}$. Der Schmelzpunkt dieser Glassorte liegt nach KHURI [in 10] oberhalb 1600°C , also fast so hoch wie der Schmelzpunkt von Quarz (1705°C).

Für die Eignung zum Bau von Mikroelektroden ist neben der Selektivität der Na-Funktion auch die Bearbeitbarkeit der Glassorten von großer Bedeutung. Die hochselektive Glassorte CORNING NAS 11-18 läßt sich leider nur sehr schwer bearbeiten. Infolge ihres hohen Erweichungspunktes muß zur Konstruktion der Mikrokapillaren das V2A - Rohr extrem erhitzt werden, es sei denn, man fertigt die Kapillaren aus

dieser Glassorte direkt in der Flamme an. In beiden Fällen ist die Gefahr groß, daß die Durchgängigkeit der wenige μ starken Kapillaren verloren geht oder daß infolge zu starken und zu langen Erhitzens des Glases die Elektrodenfunktion Schaden nimmt. Mit NAS 11-18 - Glas konnten zwar bis zu kleinsten Abmessungen sehr gute Na-Mikroelektroden gefertigt werden, doch ist infolge der geschilderten Schwierigkeiten bei der Glasbearbeitung die Zahl der mißlungenen Versuchsstücke groß.

Glücklicherweise besitzt eine andere Glassorte - INGOLD XX/14 - fast die gleiche Selektivität gegenüber Na^+ und ist darüber hinaus ausgesprochen leicht zu bearbeiten. Mit dieser gelbgrün gefärbten, Uranoxyd haltigen und infolgedessen radioaktiven Glassorte wurden bei der Konstruktion der Mikroelektroden die besten Erfahrungen gemacht. Der elektrische Widerstand ist relativ gering und der Schmelzpunkt niedrig. Die Glassorte läßt sich bei Bedarf auch leicht mit anderen Gläsern verschmelzen (z.B. OSRAM - Bleiglas 123 A). Die Herstellung von durchgängigen Mikrokapillaren aus INGOLD XX/14 - Glas bereitet keine Schwierigkeiten.

Die übrigen Na - sensitiven Glassorten standen nur in sehr geringer Menge zur Verfügung, so daß die kleine Zahl der daraus gefertigten Elektroden keine Rückschlüsse gestattet auf die allgemeine Eignung dieser Gläser zur Herstellung von Mikro-Kapillarelektroden.

Bei den hier beschriebenen Na-Mikroelektroden stand die Frage im Vordergrund, ob die bei Makro-Na-Glaselektroden inzwischen hinlänglich bekannten Eigenschaften auch gültig sind im extremen Mikrobereich, also bei Glasmembranen von weniger als $0,5 \mu$ Stärke. Dies ist insofern keineswegs selbstverständlich, da, wie oben schon erwähnt, Quellschichtdicke und Stärke der Glasmembran in vergleichbaren Größenordnungen liegen können und daher durchaus mit der Möglichkeit gerechnet werden muß, daß einzelne Bereiche

der beidseitigen Quellschichten direkten Kontakt zueinander haben. Infolge derartiger Leckstellen könnte die Membran praktisch kurzgeschlossen sein. Für die entscheidenden Eigenschaften der Na-Glaselektroden, nämlich Steilheit, Konstanz, Reproduzierbarkeit und Selektivität hatte die extrem geringe Membrandicke, wie im Rahmen dieser Untersuchungen festgestellt werden konnte, keinen nachteiligen Einfluß.

Entsprechend der logarithmischen Elektrodenfunktion ist die auf $\text{mVal Na}^+/1$ bezogene Empfindlichkeit der Na-Glaselektroden vom Konzentrationsbereich abhängig. Abb. 6 verdeutlicht dieses Elektrodenverhalten und zeigt ferner die gute Reproduzierbarkeit und hohe Konstanz bei der Na - Bestimmung mit Mikro-Kapillarelektroden.

Nach Katalogangaben der Firmen SCHOTT und BECKMAN erstreckt sich der Meßbereich für Makro-Na-Glaselektroden von 10^0 - 10^{-6} mol Na - Konzentration. Eigene Untersuchungen mit Makro-Na-Elektroden bestätigten diesen Meßumfang. Dagegen konnten mit den hier beschriebenen Mikro-Kapillarelektroden zuverlässige Na - Bestimmungen höchstens bis 10^{-4} mol Na - Konzentration durchgeführt werden. Wahrscheinlich ist die Ursache dieser Meßgrenze im Bereich niedriger Na - Konzentrationen die sich dann auswirkende Na - Abgabe der Glasoberfläche.

Gemäß der Nernst'schen Gleichung

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_1}{c_2}$$

läßt sich die theoretisch zu erwartende Elektrodensteilheit (mV/pNa-Einheit) zu 59,2 mV bei 25 °C oder 61,7 mV bei 37 °C berechnen. Da die Na-Glaselektrode jedoch auf Aktivitäten anspricht und nicht auf Konzentrationen, ist zum Beispiel zwischen 10 mVal NaCl/1 und 100 mVal NaCl/1 nach MOORE [10] nur eine Elektrodensteilheit von 55,3 mV bei 25 °C zu erwarten.

In allen Arbeiten über Mikro - Na - Elektroden werden Steilheiten zwischen 50 und 62 mV genannt. Auch die hier durchgeführten Versuche zeigten, daß die Steilheit der Mikro-Na-Elektroden meist oberhalb 50 mV/pNa-Einheit lag. Es wurden jedoch häufig auch Steilheiten gefunden, die 2 - 3 mV über dem von MOORE genannten, theoretisch zu erwartenden Wert lagen. Auf diesen Sachverhalt weisen auch DUTZ [8], PORTNOY [41a] und JANACEK [25] hin. DUTZ und PORTNOY erwähnen, der Effekt trete erst bei höheren als 0,1 bzw. 0,2 n NaCl-Konzentrationen auf. PORTNOY hält die Referenzelektrode für die diesbezügliche Ursache. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnten gelegentlich streng lineare „überhöhte“ Elektrodensteilheiten bis hinunter zu Konzentrationen um 1 mVal NaCl/l beobachtet werden.

Na-sensitive Gläser mit einer derart hohen selektiven Empfindlichkeit wie die pH-empfindlichen Glassorten gibt es bis heute nicht. Vielmehr sind alle Na-sensitiven Glassorten auch mehr oder weniger empfindlich gegenüber anderen Kationen, zeigen also einen sogenannten Fremdkationen - Fehler. In diesem Punkt bestehen zwischen den einzelnen Na-sensitiven Glassorten die größten Unterschiede.

Für die Beurteilung der Anwendbarkeit von Mikro-Na-Elektroden zur Analyse biologischer Flüssigkeiten muß vorallem der Einfluß von zwei Fremdkationen untersucht werden: Wasserstoff und Kalium.

Abb.7 zeigt den Einfluß des pH-Wertes auf die Na-Funktion einer aus INGOLD XX/14 - Glas gefertigten Mikro-Na-Elektrode. Die Grenze im sauren pH-Bereich, bis zu der eine Na-Glaselektrode Verwendung finden kann, hängt nicht nur von der jeweiligen Na-sensitiven Glassorte ab, sondern auch von der Na - Konzentration der zu untersuchenden Lösung. Je größer die Na - Konzentration, desto weiter im sauren Bereich kann die Na-Elektrode verwendet werden.

Im Falle der in Abb. 7 dargestellten Messungen mit einer Mikro-Na-Elektrode aus INGOLD XX/14 - Glas läßt sich dies etwa durch folgende Bedingung ausdrücken:

$$\text{pH} \geq \text{pNa} + 3,5$$

Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die diesbezüglichen Untersuchungen von MOORE [37], TRUESDELL [48], HANNS [17] und BECKMAN [2].

Einen vergleichbaren pH-Fehler haben auch die anderen hier untersuchten Na-sensitiven Glassorten, bis auf die Glassorten INGOLD pNa 27-8 und SCHOTT-Kationenglas, die noch Na - Messungen in einem um eine ganze pH-Einheit weiter im sauren Bereich liegenden Gebiet gestatten. (Abb.8)

Für die überwiegende Mehrzahl biologischer Flüssigkeiten stellt die gefundene pH-Grenze der Anwendbarkeit von Na-Glaselektroden kein Problem dar. Anders steht es mit dem Fremdkationenfehler bei der Anwesenheit von Kalium. Sobald bei den Glassorten SCHOTT-Kationenglas oder INGOLD pNa 27-8 die K-Konzentration nur 10 % der Na-Konzentration erreicht, macht sich ein nicht zu vernachlässigender Elektrodenfehler bemerkbar. Die Glassorten INGOLD XX/14 und SCHOTT pNa - HM 3397 gestatten dagegen genaue Na-Messungen bis zur 10-fachen K-Konzentration der vorhandenen Na-Konzentration. (Abb. 9)

Die höchste hier gefundene Selektivität Na/K wies die Glassorte CORNING NAS 11-18 auf, bei der sich ein K - Fehler erst bemerkbar machte, wenn die K - Konzentration mehr als das 10fache der Na-Konzentration betrug, was sich etwa durch folgende Bedingung ausdrücken läßt:

$$\text{pK} > \text{pNa} - 1$$

(pK bzw. pNa sind die negativen dekadischen Logarithmen der Kalium- bzw. Natriumkonzentration, analog zur Definition des pH-Wertes.)

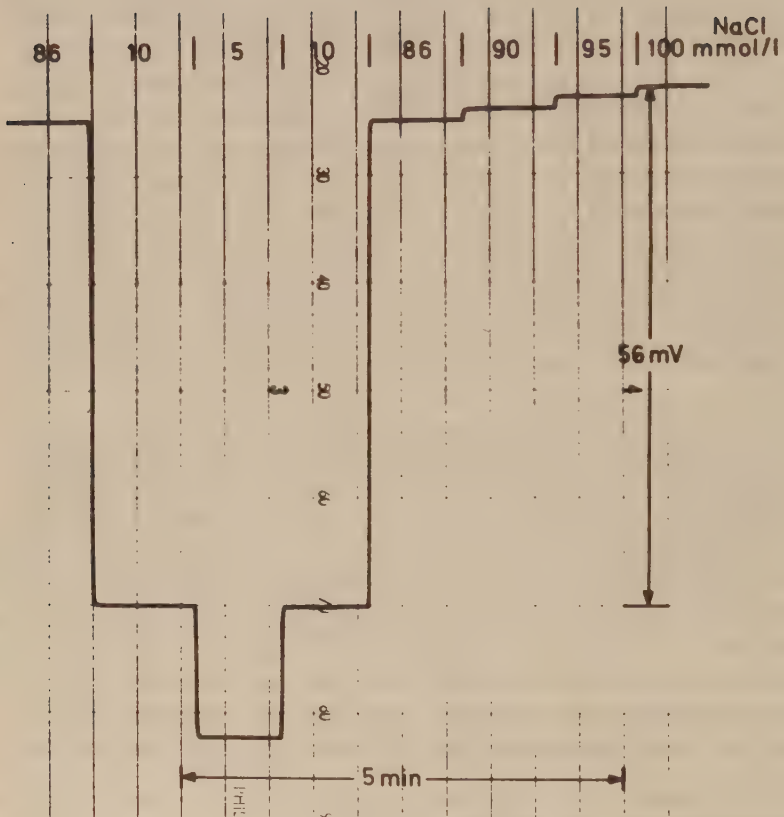


Abb.6

Nachweisempfindlichkeit einer Mikro-Na-Elektrode
in verschiedenen Konzentrationsbereichen

(Eigenbau Na 105, INGOLD XX/14 - Glas)

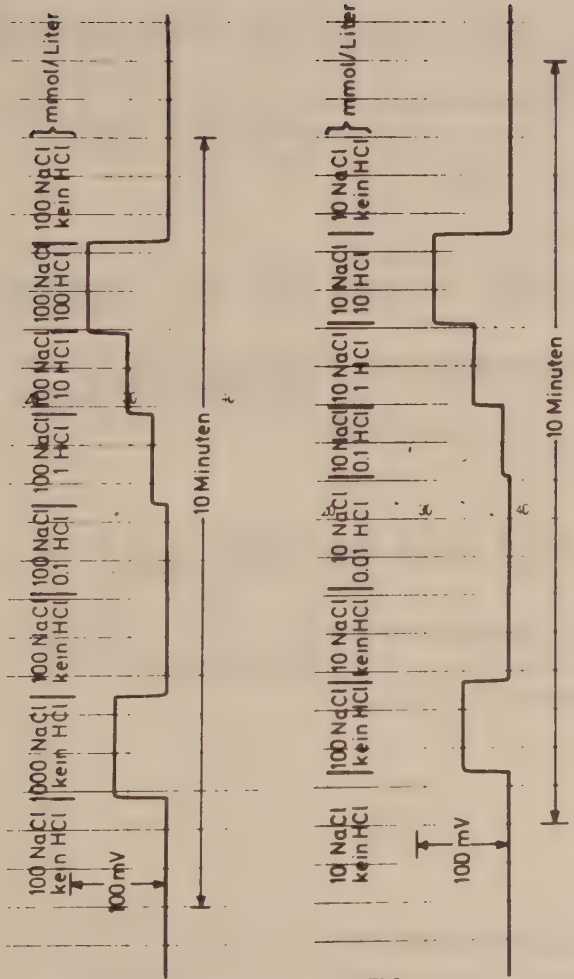


Abb.7

pH - Fehler einer Mikro-Na-Elektrode (Na 105)

Untersuchung der pH-Funktion durch stufenweise Zugabe von HCl zu konstanter 100 mmol NaCl - Lösung (oben) bzw. 10 mmol NaCl - Lösung (unten). Im linken Teil der Abbildung ist zur Kontrolle die Na-Funktion (ohne HCl) jeweils über eine volle pNa-Einheit mit aufgezeichnet.

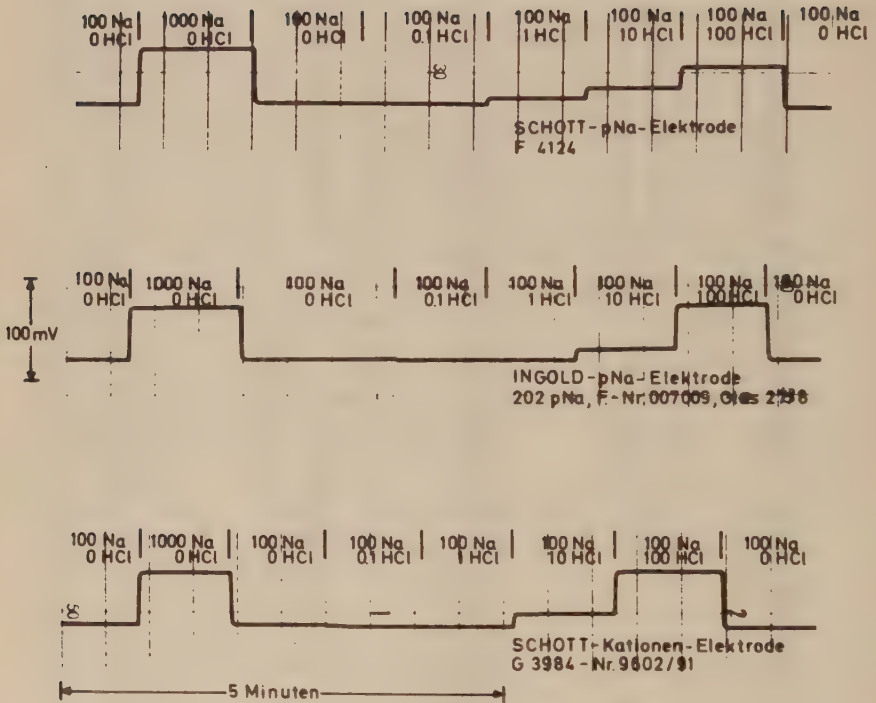


Abb.8

pH-Fehler verschiedener Natrium-Elektroden

(Angaben über die Zusammensetzung der Testlösungen
in mmol / l)

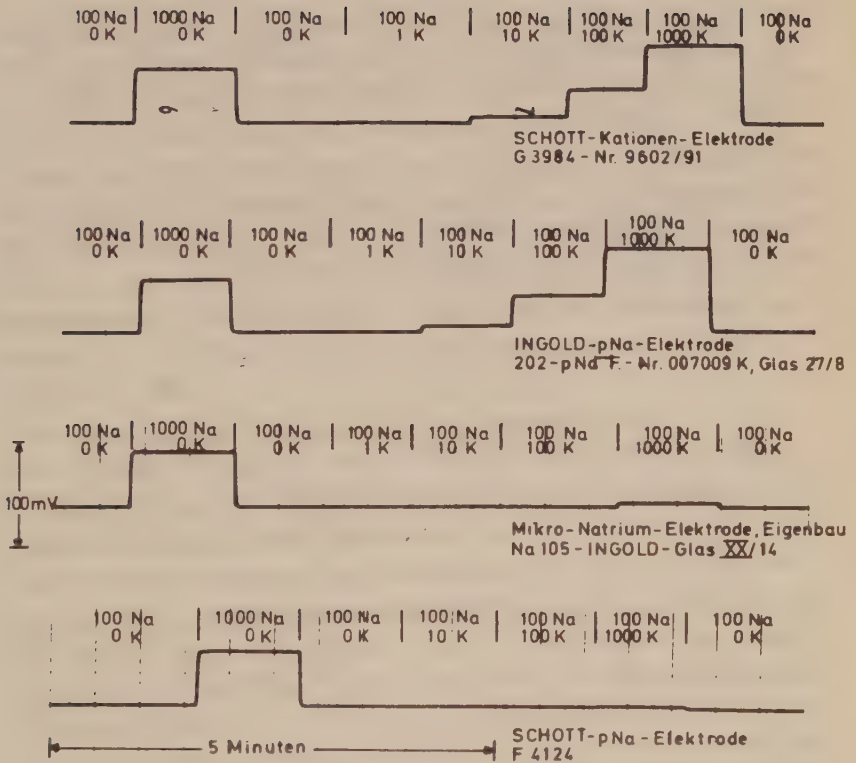


Abb. 9

Kaliumfehler verschiedener Natrium-Elektroden

(Angaben über die Zusammensetzung der Testlösungen
jeweils in mmol / l)

Kalium-Elektroden

Bei der Analyse biologischer Flüssigkeiten ist die Kenntnis der Kalium-Konzentration oft besonders wichtig. Es besteht daher auch Interesse an der Entwicklung von Mikro - Kalium - Elektroden.

Für die Herstellung der Mikro-K-Elektroden stand nur eine einzige selektiv K - empfindliche Glassorte in geringer Menge zur Verfügung: CORNING NAS 27-4. Die Bearbeitung dieser Glassorte ist ausserordentlich schwierig.

Nach HINKE [18] hat NAS 27-4 - Glas folgende Zusammensetzung:

63 mol %	SiO_2
27 mol %	Na_2O
7 mol %	Al_2O_3
3 mol %	CaO

Erweichungspunkt und Schmelzpunkt dieser Glassorte sind niedriger als bei der Na-sensitiven Sorte NAS 11-18. PORTNOY [41a] nennt für NAS 27-4 einen Erweichungspunkt um 500 °C.

Die Schwierigkeit in der NAS 27-4 - Bearbeitung liegt vor allem darin, daß dieses Glas in erhitztem Zustand sehr leicht entglast und in seinem Innern Gaseinschlüsse bildet. Ferner neigt die Glassorte dazu, feine Mikrorisse auszubilden. Die Oberfläche des Ausgangsmaterials bereits ist milchig trüb und läßt bei Berührung an den Fingern mehlfeinen Glasstaub haften. GEYER und FRANK [15] berichten über ähnliche Beobachtungen mit einer im Glaswerk VEB SCHOTT - JENA gefertigten, K-sensitiven Glassorte.

Die Versuche, Kalium-Mikroelektroden der in Abb.1 dargestellten Form zu konstruieren, waren daher nur zum Teil erfolgreich. Bis zur Größenordnung von etwa 100 Nanolitern zeigten diese Elektroden eine konstante und reproduzierbare Elektrodenfunktion für K^+ , doch blieb die Steilheit umso mehr hinter dem theoretisch zu erwartenden Wert zurück, je kleiner die Kapillar-Elektroden waren. Abb.10 zeigt die Eichung einer solchen K-Elektrode im Mikroliterbereich mit einer Steilheit von 42 mV/pK-Einheit. Für den pH - Bereich,

nen, ließ sich die Gesetzmäßigkeit finden (Abb. 11):

$$\text{pH} > \text{pK} + 3$$

Ist die Lösung, deren K-Konzentration bestimmt werden soll, zu sauer, so macht sich dies häufig in einer Trift der Elektrodenspannung bemerkbar. Diese Eigenschaft haben die K-Elektroden mit den Na-Elektroden gemeinsam.

Die Selektivität der K-Gläser ist wesentlich geringer als diejenige der Na-Glassorten. MCLAUGHLIN [34a] nennt eine K/Na - Selektivität von 1:1 bis 2:1, EISENMAN [9], MOORE [38] und MATTOCK [in 10] weisen darauf hin, daß die K - Selektivität stark von der Wässerungszeit abhängt und anfangs 3:1, nach jahrelanger Wässerung schließlich 10:1 betragen kann.

Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß sich bei gleichen Mengen K^+ und Na^+ in der zu untersuchenden Lösung bereits ein erheblicher Fehler in der Funktion der K-Glaselektroden bemerkbar macht (Abb. 12).

Ist die Na-Konzentration bekannt, so läßt sich mit Hilfe von Eichkurvenscharen der Natriumfehler der K-Glaselektroden weitgehend eliminieren. Für Untersuchungen biologischer Flüssigkeiten ist dies Verfahren jedoch umständlich und, insbesondere wenn die K- und Na-Konzentrationen in weiten Grenzen schwanken können, oft auch nicht genau genug. Vor übertriebenen Ansprüchen an die in solchen Fällen mit K-Elektroden erreichbare Genauigkeit warnen auch MATTOCK [in 10] und NUTBOURNE [39].

Aus der Glassorte NAS 27-4 konnten im Nanoliter-Bereich nur Mikroelektroden mit unbefriedigender Funktion hergestellt werden. Die Elektrodenfunktion war unvollständig, die Spannungsanzeige triftete und auch die Reproduzierbarkeit war ungenügend.

Die Glassorte NAS 27-4 ist extrem leicht löslich. KHURI [in 10] beobachtete das vollständige Auflösen eines Glas-

fadens dieser Glassorte innerhalb weniger Tage. Offenbar ist es nicht möglich, aus NAS 27-4 - Glas die für Mikro-Kapillar-Elektroden erforderlichen extrem dünnen Glasmembranen ohne Verlust der exakten Elektrodenfunktion herzustellen. Für eine gute K-Funktion wäre längeres Wässern wünschenswert, die leichte Löslichkeit der Glassorte schließt aber für Nanoliter-Elektroden jedes längere Wässern aus. Die im Nanoliterbereich hier stets beobachtete Trift beruht vermutlich auf den in Lösung gehenden Alkali-Bestandteilen der sensitiven Glassorte.

Es ist anzunehmen, daß mit anderen K-empfindlichen Glassorten auch selektiv K-empfindliche Mikroelektroden der in Abb.1 dargestellten Form für den Bereich weniger Zehntel Nanoliter konstruiert werden können. PORTNOY [41a] zum Beispiel berichtet über sehr gute Erfahrungen mit der K-sensitiven Glassorte CORNING KAS 20-5. Für die hier beschriebenen Untersuchungen stand jedoch nur die K-sensitive Glassorte NAS 27-4 zur Verfügung.

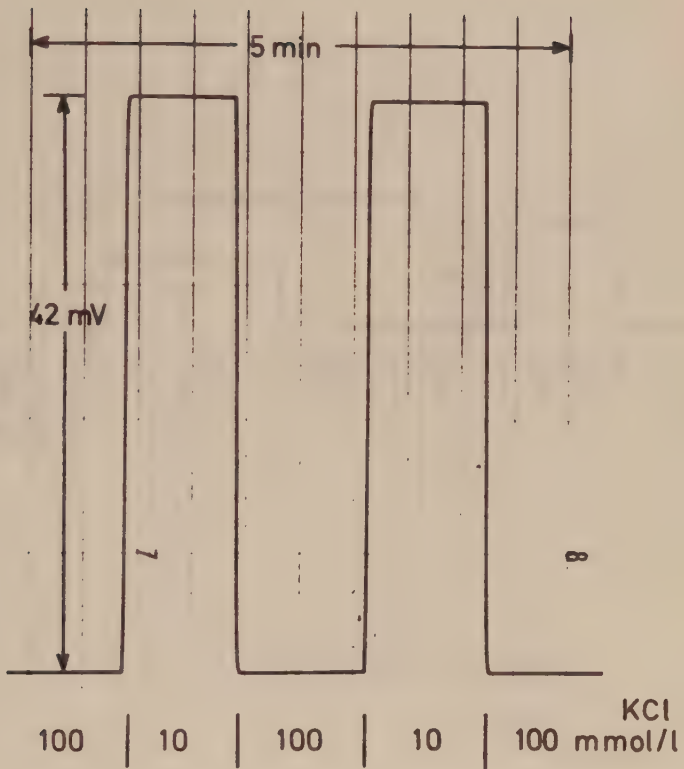


Abb. 10

Elektrodenfunktion einer Mikro-Kalium-Elektrode

(Eigenbau K 124, CORNING NAS 27-4 - Glas)

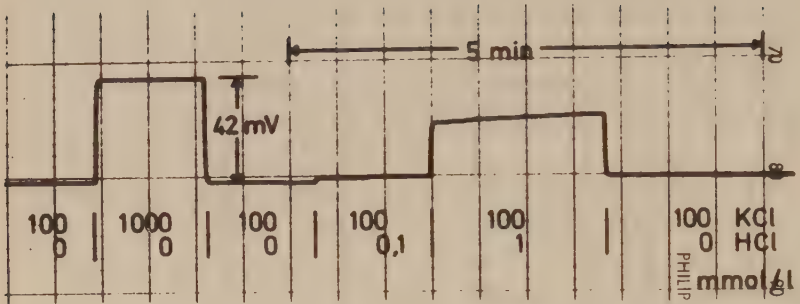


Abb.11

pH-Fehler einer Mikro-Kalium-Elektrode

(Eigenbau K 140, CORNING NAS 27-4 - Glas)

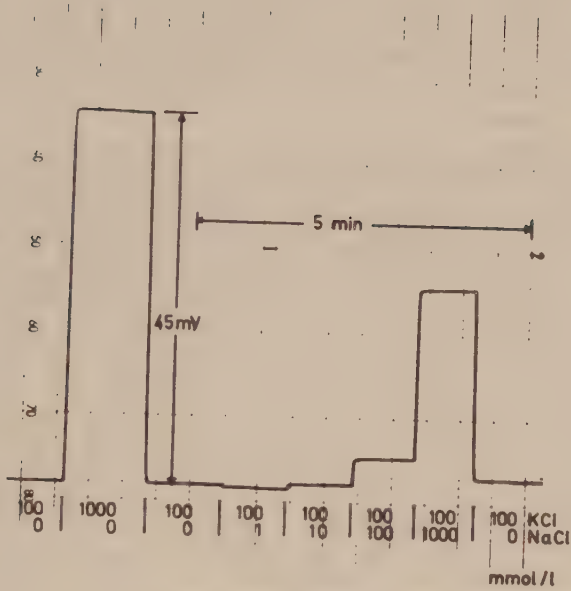


Abb.12

Natrium-Fehler einer Mikro-Kalium-Elektrode

(Eigenbau K 124, CORNING NAS 27-4 - Glas)

Referenzelektroden

Obwohl der Bau der Referenzelektroden sehr viel einfacher ist als derjenige der Mikro-Kapillar-Elektroden, zeigte es sich doch, daß die Referenzelektroden die weitaus häufigste Fehlerursache sind. Man vermeidet diese Fehler größtenteils, wenn stets nur neu gefertigte Referenzelektroden verwendet werden. Am besten bewährte sich folgende Konstruktion:

Kapillaren aus gewöhnlichem Laborglas wurden mit einem Pulver zu Spitzen ausgezogen und bis zu einer Spitzenöffnung von 5 - 10 μ angeschliffen. Dieser Öffnungsdurchmesser erwies sich für die Füllung der Referenzelektroden als günstiger als der von KHURI [in 10] angegebene Durchmesser von 1 - 5 μ . Nach Auffüllen des weiten Teiles der Kapillare mit noch heißer KCl-Agar-Lösung (1g Agar auf 100 ml konz. KCl) wurde mit Hilfe von 5 atü Druckluft die Kapillare bis zur vordersten Spitze gefüllt. Durch vorheriges Anschmelzen des weiten Kapillarendes muß dafür gesorgt werden, daß die chlorierte Schicht des Silberdrahtes beim Einführen nicht zerkratzt wird. Die weite Öffnung der Referenzelektrode muß auf jeden Fall unverschlossen bleiben, da sonst bei geringsten Temperaturänderungen an der Spitze KCl austritt oder Luftblasen eingesogen werden. Es empfiehlt sich, die Stärke des Silberdrahtes nicht zu gering zu wählen. Mit 500 μ - Drähten wurden sehr gute Erfahrungen gemacht. 100 μ - Drähte und noch dünnere Drähte knicken zu leicht beim Einbringen in die Referenzelektrode, was zu einer Beschädigung ihrer Chlorierungsschicht und zur dadurch bedingten Störung der Elektrodenfunktion führen kann.

Der KCl-Austritt der hier beschriebenen Referenzelektrode ist vernachlässigbar gering. Auch nach mehrmaliger Lokalisierung der Referenzelektroden-Spitze in einer Mikroprobe ließ sich keine Veränderung der Zusammensetzung der Meßflüssigkeit feststellen. - Der elektrische Widerstand dieser Referenzelektroden (10^6 - 10^7 Ohm nach HINKE [10]) ist im Vergleich zu demjenigen der Mikro-Glaselektroden unbedeutend.

Erreichbare Meßgenauigkeit

Die Genauigkeit der Messungen mit Mikro-Glaselektroden wird einerseits durch eventuell vorhandene systematische Fehler beeinflusst, andererseits durch die Fehlerbreite jeder Einzelmessung und schließlich dadurch, daß die Eichkurven der gesamten Anordnung vor und nach jeder Meßreihe meist nicht exakt übereinstimmen.

Es ist ein besonderer Vorteil der Messungen mit Glaselektroden, daß die meisten systematischen Fehler sich leicht erkennen und beseitigen lassen. Eine durch Lufteinschlüsse oder auskristallisiertes KCl unbrauchbar gewordene Referenzelektrode macht sich durch inkonstante, nicht reproduzierbare Spannungsanzeige sofort bemerkbar. Ähnlich wirkt es sich aus, wenn die Spitze der Referenzelektrode abgebrochen ist und infolge KCl-Austritt die Zusammensetzung des Meßgutes verfälscht wird, oder wenn die Spitze der Referenzelektrode keinen Kontakt mit dem Mikrotropfen hat. Ist Öl in die Kapillare der Glaselektrode oder in die Spitze der Referenzelektrode eingedrungen oder ist der sensitive Teil der Kapillare nur zum Teil mit Flüssigkeit gefüllt, tritt ebenfalls sofort eine deutlich wahrnehmbare Trift der Geräteanzeige auf.

Während sich diese systematischen Fehler relativ leicht beseitigen lassen (notfalls durch Austausch der Elektroden), ist eine Verfälschung der Zusammensetzung des Meßgutes infolge Alkali-Abgabe der Glasoberfläche der sensitiven Kapillare sehr viel problematischer. Für Natrium-Bestimmungen in Konzentrationsbereichen oberhalb 1 mVal Na/l ist dieser Fehler meist unerheblich. Für pH-Bestimmungen schwach gepufferter Lösungen ist jedoch zu beachten, daß hier der ursprünglich vorhandene pH-Wert in Gegenwart von Alkali abgebenden Glasoberflächen stark verfälscht werden kann.

Bei Mikro-pH-Bestimmungen ist die mit der Lösung im Ionen-austausch stehende Glasquellschicht relativ groß, verglichen mit der Lösungsmenge. Infolgedessen kann sich manchmal der pH-Wert einer ungepufferten oder schwach gepufferten Lösung mit Makroelektroden relativ leicht messen lassen, nicht dagegen der pH-Wert von Mikroproben derselben Lösung mit Mikro-pH-Elektroden. Durch längeres Wässern der Elektroden läßt sich dieser Fehler reduzieren. Leider ist gerade bei der sonst so bewährten Glassorte CORNING 0150 auch noch nach längerem Wässern die pH-Veränderung ungepufferter Lösungen durch Alkali-Abgabe des Glases relativ groß, was sich in einer über Stunden sich erstreckenden, ins Alkalische gehenden Trift der Elektrodenfunktion in solchen Fällen bemerkbar machen kann. Mikro-pH-Elektroden aus dem Titanoxyd enthaltenden pH-Glas der Firma INGOLD zeigten diesen systematischen Fehler in weit geringerem Ausmaß. Diese Beobachtungen stimmen mit den bei SCHWABE [47] über die Löslichkeit verschiedener sensitiver Glassorten gemachten Angaben gut überein.

Biologische Flüssigkeiten ändern infolge Zersetzung oft im Laufe der Zeit ihren pH-Wert. Die pH-Messung muß daher möglichst unmittelbar nach Probenentnahme erfolgen. Fehlmessungen infolge CO_2 -Verlust der Probe lassen sich mit der im letzten Kapitel beschriebenen und in Abb.21 dargestellten Anordnung vermeiden. Die Kapillar-Elektrodenform verhindert auch zuverlässig eine Änderung des pH-Wertes der Probe infolge Luftzutritt während des Meßvorganges. In gut äquilibriertem Öl ändert sich auch die Na- oder K-Konzentration von Mikroproben innerhalb der Meßzeit nicht wesentlich.

Unter Berücksichtigung der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen lassen sich also die meisten systematischen Fehlerquellen umgehen. Dagegen streuen auch bei gut funktionierenden Elektroden sowohl bei pH- als auch bei Na-Mikrobestimmungen die Ergebnisse etwas bei wiederholter Messung ein- und derselben Mikroprobe. Abb.13 zeigt dieses Verhalten am Bei-

spiel von 406 mehrfach durchgeführten Mikro-Na-Bestimmungen. Der mittlere Wiederholungsfehler betrug hierbei 0,37 mV.

Etwas größer ist der Fehlereinfluß durch Änderung der Eichdaten. Auch gute Eichkurven, wie sie im Falle einer pH - Elektrode in Abb.14 und im Falle einer Na-Elektrode in Abb.15 dargestellt sind, erfahren im Laufe einer Messung oft geringfügige Verschiebungen. Aus 84 nach ein oder zwei Stunden Meßzeit nochmals geprüften Na-Eichwerten z.B. ließ sich eine mittlere Verschiebung der Eichkurve um 0,84 mV errechnen.

Für Mikro-Na-Bestimmungen läßt sich hieraus der mittlere Gesamtfehler zu 1,21 mV bestimmen. Bei der durchschnittlichen Elektrodensteilheit von 57 mV entspricht dies etwa 0,02 pNa-Einheiten. Hieraus berechnet sich für den Konzentrationsbereich um 140 mVal Na/l der mittlere Fehler zu rund 6,5 mVal Na/l, also etwa 4 - 5 %. Im Bereich um 14 mVal Na/l beträgt dieser Fehler dementsprechend nur rund 0,7 mVal Na/l. Etwa dieselbe Fehlerbreite für Mikro-Na-Elektroden nennt auch LEV [33].

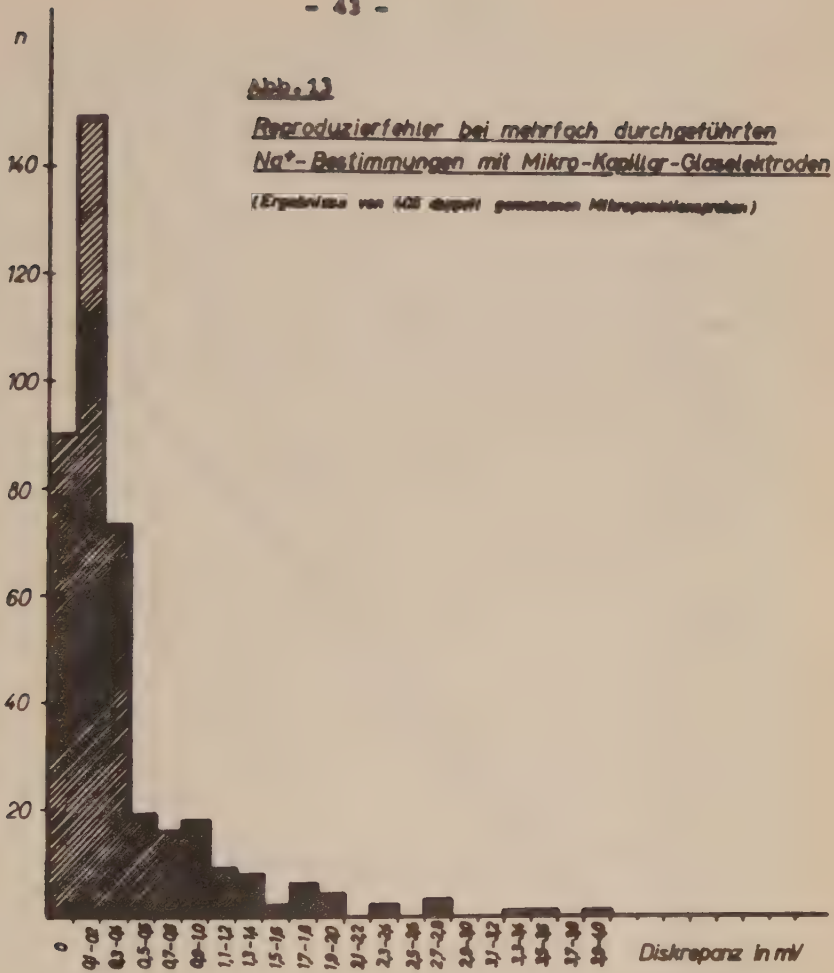
EISENMAN [9], FRIEDMAN [12], NUTBOURNE [59] und andere geben für Makro-Na-Glaselektroden im Bereich von 140 mVal Na/l einen Fehler von 0,5 - 3 mVal Na/l an. Diese Zahlenangaben beziehen sich jeweils auf absolute Na-Konzentrationen. Relative Konzentrationsunterschiede von 1 - 2 mVal Na/l lassen sich auch mit Mikroelektroden in diesem Konzentrationsbereich mit Sicherheit nachweisen.

In zahlreichen Untersuchungen (z.B. EISENMAN [9], FRIEDMAN [14], MOORE [37], MATTOCK [in 10] und NUTBOURNE [39,40]) wurden die Eigenschaften von Makro-Na-Glaselektroden mit denjenigen von Flammenphotometern verglichen. Übereinstimmend wurde dabei festgestellt, daß die Na-Glaselektroden hinsichtlich ihrer Genauigkeit den Flammenphotometern mindestens ebenbürtig, in mancher Hinsicht jedoch sogar überlegen sind. Dies zeigt, welche Bedeutung die Na-sensitiven Glaselektroden in Zukunft sowohl im Makro- wie erst recht im Mikrobereich mit Sicherheit erlangen werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß bei Abwesenheit systematischer Fehlerquellen hinsichtlich der mittleren Fehlerbreite zwischen Mikro-Na- und Mikro-pH-Elektroden der in Abb.1 dargestellten Form bezogen auf den negativen dekadischen Logarithmus der Ionenkonzentrationen kein prinzipieller Unterschied besteht. Der mittlere Fehler in der pH-Bestimmung liegt dementsprechend bei etwa 0,02 pH - Einheiten bei Messungen im Nanoliterbereich.

Die Erfahrung in der Handhabung von Mikro-Glaselektroden ist übrigens - wie bei jeder Mikromeßmethode - für die Fehlerbreite des Meßergebnisses offenbar von großer Bedeutung. Ein Vergleich der hier im Verlauf von 6 Monaten mit Mikro-Na-Elektroden gewonnenen Ergebnisse zeigte z.B. einen deutlichen Rückgang des mittleren Fehlers mit der wachsenden Zahl der Mikropunktions-Untersuchungen.

Obwohl kationen-sensitive Glaselektroden auf Aktivitäten ansprechen, lassen sich auch die Konzentrationen daraus bestimmen. Genaue diesbezügliche Methoden für biologische Flüssigkeiten werden u.a. von NUTBOURNE [29] und MOORE [37] beschrieben.



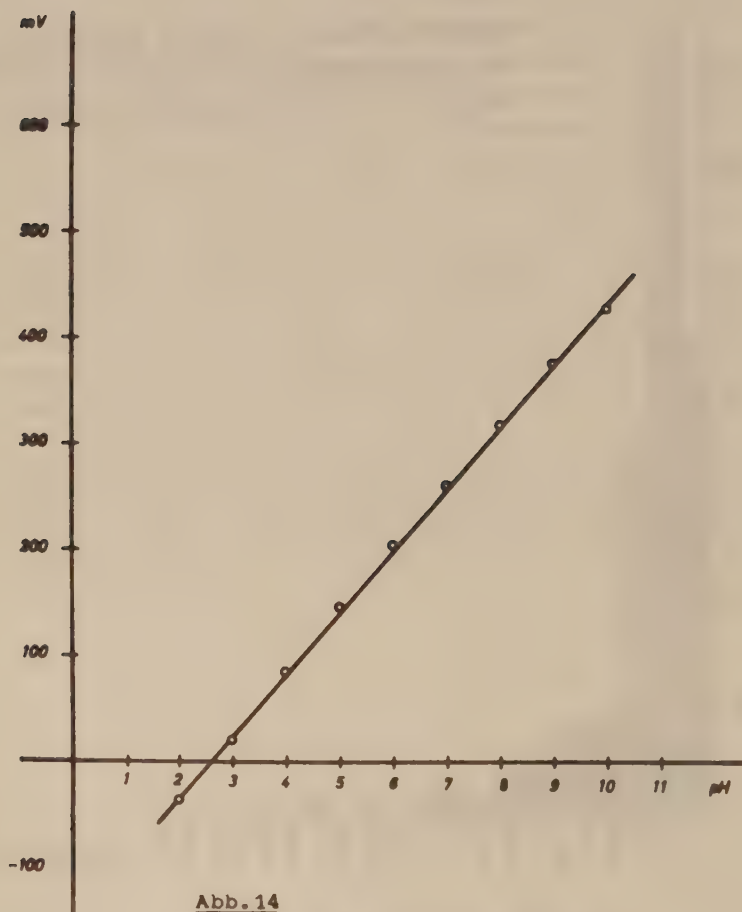


Abb. 14

Eichkurve einer pH-Nanoliter-Elektrode

(Elektrode pH-219 aus CORNING 0150 - Glas;

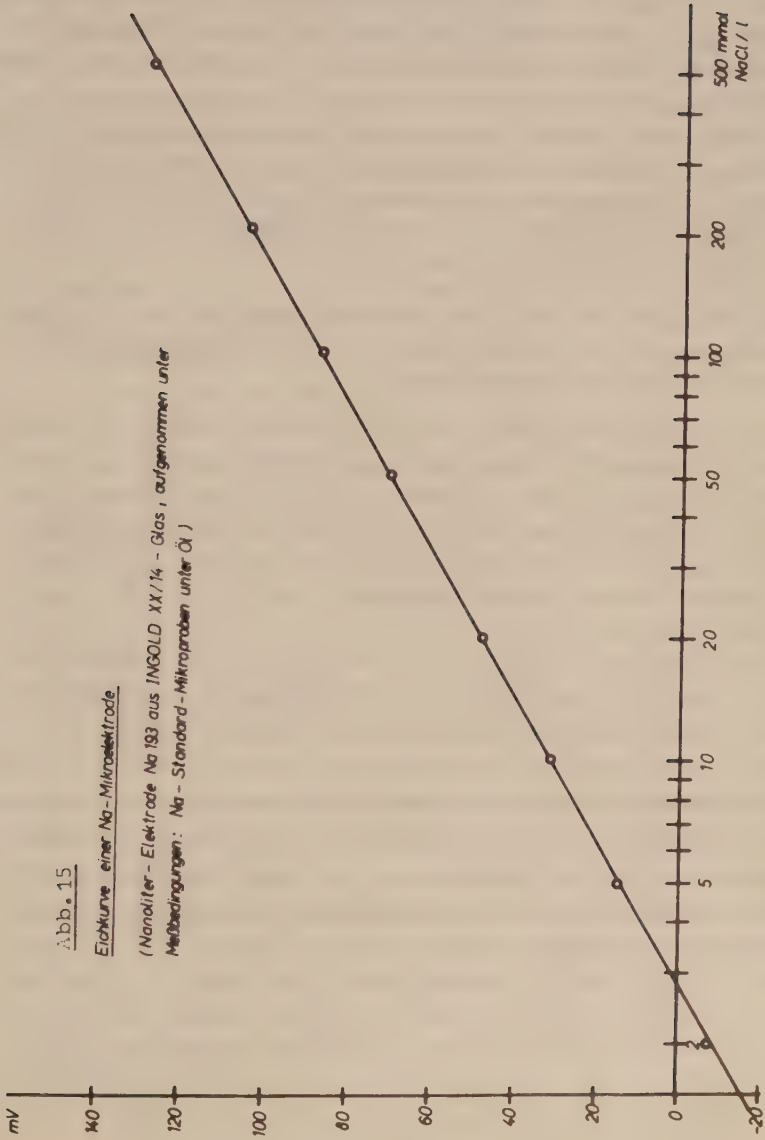
aufgenommen unter Meßbedingungen:

TITRISOL-Puffer in Mikrotropfen unter Öl.)

Abb. 15

Eichkurve einer Na-Mikroelektrode

(Nanoliter-Elektrode Na 193 aus INGOLD XX/14 - Glas, aufgenommen unter
Messbedingungen: Na - Standard-Mikroproben unter Öl)



Vorzüge dieser Kapillar-Elektroden-Form

Die Messungen mit Glaselektroden sind in mehrfacher Hinsicht sehr vorteilhaft. Die Durchführung der Analysen geht schnell, die Genauigkeit ist groß und die Meßflüssigkeit wird weder verbraucht noch vermischt, so daß sie nach durchgeführter Messung in vollem Umfang für weitere Analysen zur Verfügung steht. Kapillar-Elektroden zeichnen sich allgemein durch geringe Asymmetrie-Potentiale und durch ein günstiges Volumen-Oberflächen-Verhältnis aus (KHURI [10]). Die hier beschriebene Form einer Mikro-Kapillar-Elektrode hat einige zusätzliche Vorteile:

- 1) Durch Verzicht auf Glasverschmelzungen ist es möglich, diese Art der Mikroelektroden aus allen selektiv empfindlichen Glassorten herzustellen.
- 2) Die Elektroden lassen sich leicht und schnell in großen Stückzahlen herstellen. Dies ist besonders wichtig, da im Nanoliterbereich durch Abbrechen der Spitze und vorallem durch Verstopfen der Kapillare immer mit einem gewissen Verschleiß an Elektroden gerechnet werden muß. Als einzig wirksamen Schutz dagegen empfiehlt auch KHURI [10] die Herstellung hinreichend vieler Mikroelektroden. Trotz der großen Zahl der Schritte zur Herstellung dieser Kapillarelektroden ist jeder einzelne Arbeitsgang doch so einfach, daß er auch ohne Zuhilfenahme eines Mikroskopes durchgeführt werden könnte. Die Verwendung eines Binokular-Mikroskopes erleichtert den Bau der Elektroden jedoch erheblich. Wie ein Mitarbeiter des Institutes gezeigt hat, ist die gesamte Technik der Herstellung und Handhabung der hier entwickelten Form einer Mikro-Kapillar-Elektrode in wenigen Tagen erlernbar.

3) Durch Wahl einer entsprechend weiten oder engen Kapillare kann das Volumen der Elektroden schon bei Beginn der Konstruktion den Versuchserfordernissen genau angepaßt werden. Elektroden mit einem Lösungsbedarf von weniger als 1 Nanoliter verstopfen bei der Analyse biologischer Flüssigkeiten sehr leicht und können dann meist nicht wieder durchgängig gemacht werden. Zur Vermeidung eines erhöhten Elektrodenverschleißes ist es daher wichtig, die Elektroden nicht kleiner als jeweils erforderlichlich anzufertigen.

4) Die im Elektroden-Inneren frei endende Mikrokapillare verhindert ein Aufsteigen der gesamten Meßflüssigkeit bis in den weiten Teil der Ansaugkapillare. Auf die Ausübung eines sonst erforderlichen Gegendruckes kann deshalb verzichtet werden und es ist leicht, in den Resttropfen die Spitze der Referenzelektrode zu lokalisieren.

5) Die Art der Herstellung der Mikrokapillaren gewährleistet, daß die empfindlichen Glassorten nur kurze Zeit bei möglichst geringer Temperatur bearbeitet werden. Die Elektrodenfunktion bleibt daher auch bei den kleinsten Elektroden weitgehend erhalten (abgesehen von der Glassorte NAS 27-4).

6) Die Mikrokapillaren sind sehr gleichmäßig in ihren Abmessungen, es treten keine „Engstellen“ auf. Die Gefahr einer Verstopfung selbst der kleinsten Elektroden ist dadurch reduziert.

Diese Art der Herstellung sehr gleichmäßiger Mikrokapillaren eignet sich übrigens auch gut zur Konstruktion von Mikro-Eichpipetten.

7) Die extrem dünne Glasmembran der Mikrokapillaren erfordert für den Einsatz der Elektroden nur kurze Wässerungszeiten. Die Elektroden können daher in ungefülltem Zustand aufbewahrt werden. Sie sind dann in staubfreier Umgebung nahezu unbegrenzt lagerfähig. Ein weiterer Vorteil der

dünnen Glasmembran besteht in der sehr kurzen Ansprechzeit der Elektroden.

8) Die Verwendung von Silicagelkörnern sorgt für die Konstanz der Elektrodeneigenschaften. Die beschriebenen Mikroelektroden können monatelang verwendet werden.

In undichten Elektroden bildet sich ein Feuchtigkeitsfilm auf den Glasoberflächen aus, der die Elektrodenfunktion beeinträchtigt und schließlich zunichte macht. Derart unbrauchbar gewordene Elektroden können aufgrund der Silicagel-Verfärbung sofort erkannt und ausgeschieden werden.

Andere Elektrodenformen

Die Selbstanfertigung von Glaselektroden ist sehr oft von großem Vorteil, da für viele biologische Problemstellungen die Messung von pH, K^+ oder Na^+ erforderlich ist, jedoch dafür keine geeigneten Glaselektroden der gewünschten Form und Größenordnung im Handel erhältlich sind.

Abb. 16 und Abb. 17 zeigen schematisch einige Sonderformen von Glaselektroden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für spezielle Anwendungen angefertigt wurden.

Eine Durchflußelektrode von dem in Abb. 16 A dargestellten Typ gestattet die kontinuierliche und gleichzeitige Registrierung von pH, Na^+ und K^+ . Bei derartigen Elektroden ist es technisch möglich, den Fremdkationen-Fehler kontinuierlich elektronisch im Registriergerät zu kompensieren. PORTNOY [41a], FRIEDMAN [13] und EISENMAN [9] beschreiben solche Anordnungen für Makroelektroden.

Abb. 16B zeigt eine einfache Durchflußelektrode mit Thermostatanschluß, die sich leicht im Mikroliter-Bereich herstellen läßt und überall dort erfolgreich eingesetzt werden kann, wo bei bestimmter und konstanter Temperatur gemessen werden soll.

pH, Na^+ und K^+ lassen sich kontinuierlich an unzugänglichen Stellen mit der in Abb. 16 C dargestellten Spitzenelektrode messen, die eine flexible Zuleitung besitzt. Die erheblichen Isolationsschwierigkeiten an der Verbindungsstelle zwischen Kabel und Glaselektrode gestalten die Herstellung derartiger Elektroden nicht leicht. Die kleinsten Glaselektroden, die nach diesem Schema gefertigt wurden, hatten an der dicksten Stelle einen Durchmesser von nur 500 μ . Die Lebensdauer dieser Elektroden erwies sich als recht gering. Schon nach wenigen Tagen war die anfangs brauchbare Elektrodenfunktion infolge Undichtigkeiten an der Kabel-Glas-Verbindung verschwunden. In größeren Ab-

messungen wird eine ähnliche Elektrodenform von SCHMIDT-KESSEN [46] beschrieben.

Es lag nahe, auch die Konstruktion von Mikro-Spitzen-Elektroden zu versuchen, da sie im Gegensatz zu den Kapillar-Elektroden kontinuierliche Messungen im Mikrobereich gestatten. Mit der in Abb. 17 dargestellten Form konnten brauchbare Ergebnisse für Na^+ - und pH-Bestimmungen erzielt werden. Der sensitive Teil an der Spitze hatte einen Durchmesser von etwa $15\ \mu$ und war bei den kleinsten Exemplaren $30\ \mu$ lang.

Wie Tabelle 2 zeigt, sind vereinzelt schon sehr viel kleinere Spitzenelektroden gebaut worden. Ausser den in dieser Tabelle erwähnten Verfassern haben auch HIRAKAWA [20], JANACEK [25] und VOROBIEV [51,52] Arbeiten mit Spitzenelektroden durchgeführt.

Im Ultramikro-Bereich ist die Anfertigung derartiger Spitzenelektroden sehr viel aufwendiger und schwieriger als diejenige der Kapillarelektroden. Die Einstellzeit der Spitzenelektroden dieser Größenordnung beträgt im Allgemeinen mehrere Minuten und auch dann noch triftet häufig die Elektrodenfunktion etwas. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Grenzschicht zwischen sensitivem und nicht-sensitivem Teil. Bei den gekitteten oder auch den verschmolzenen Mikro-Spitzen-Elektroden ist dieser Grenzbe-
reich verglichen mit der gesamten Fläche der winzigen sensitiven Spitze doch schon relativ groß. Auch wird das sensitive Glas bei der Herstellung der Spitzen sehr viel länger und intensiver der Hitze ausgesetzt als bei der Herstellung der Mikrokapillaren.

Die luftblasenfreie Füllung bis zur vordersten Spitze ist ein weiteres Problem, sie gelingt oft nicht. Am einfachsten erwies es sich, die Spitze erst in gefülltem Zustand unter dem Mikroskop zuzuschmelzen. Das sensitive Glas wird dabei jedoch stark beansprucht. Die Gefahr der Ausbildung feiner

Risse im Glas ist groß und zusätzlich führt das Verfahren zu einer für die Anwendung oft unerwünschten Abrundung der vordersten Spitze.

Um den elektrischen Widerstand der sensitiven Spitze innerhalb meßtechnischer Grenzen zu halten, muß die Glasmembran möglichst dünn sein. Für den Gebrauch der Spitzenelektrode, etwa beim Durchstechen biologischer Membranen, ist dies von großem Nachteil. Hinzu kommt, daß bei den meisten biologischen Anwendungen dieser Elektroden der interessierende Mikrobereich notwendig von einer schützenden Ölschicht bedeckt sein muß. Die empfindliche Spitze der Elektrode überzieht sich also zunächst mit einem Ölfilm, bevor sie in der eigentlichen Meßsubstanz lokalisiert werden kann. Selbst bei Makro-Glaselektroden führt ein solcher Ölfilm auf der Glasmembran zu Störungen der Elektrodenfunktion. RECTOR [43] und ROENNEFAHRT [45] weisen auf diese Fehlerquelle hin.

Die Meßschwierigkeiten mit Mikro-Spitzen-Elektroden vergrößern sich noch erheblich, wenn biologische Membranpotentiale der Elektrodenfunktion überlagert sind, etwa bei intrazellulären Untersuchungen.

Auf Grund all dieser möglichen Fehlerquellen ist es erklärbar, warum die bisher mit Mikro-Spitzen-Elektroden zustande gekommenen Veröffentlichungen zum Teil nicht unwidersprochen geblieben sind. Zum Beispiel unterscheiden sich die von KOSTYUK und SOROKINA [31] einerseits und CARTER et al. [5, 6] andererseits mit Mikro-Spitzen-Elektroden durchgeführten intrazellulären pH-Bestimmungen um mehr als eine volle pH-Einheit.

Man sollte die Anwendung der Mikro-Spitzen-Elektroden daher auf solche Fälle beschränken, in denen Kapillar-Elektroden nicht verwendet werden können (z.B. bei kontinuierlichen intratubulären oder intrazellulären in vivo - Messungen).

Überall dort, wo das Meßgut in Form von Mikrotröpfchen unter Öl gebracht werden kann (etwa bei Mikropunktionsproben), lassen sich die Messungen mit den leicht herzustellenden Kapillarelektroden sehr viel genauer, schneller und auch einfacher durchführen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind die Arbeiten zur Entwicklung wesentlich kleinerer Spitzen-Elektroden der hier beschriebenen Art noch nicht abgeschlossen.

Tabelle 2

Entwicklung der Spitzenelektroden (Einstichelektroden)			
Glaselektroden für pH-Messungen			
Jahr	Verfasser	Abmessungen des sensitiven Teils der Elektroden	
		Länge	Durchmesser
1938	Voegtlin, Kahler, Fitch	einige mm	einige mm
1940	Ball [1] [50]	20 mm	40 /u
1954	Caldwell [3]	200 /u	50 /u
1960	Kostyuk, Sorokina [31]	10 /u	1 /u
1967	Carter, Rector, Campion Seldin [5,6]	5 /u	0,5 /u
Glaselektroden für Natrium- und Kalium-Messungen			
1959	Hinke [18]	150 /u	20 /u
1963	Khuri, Goldstein, Mande Edmonds, Solomon [26]	100 /u	5 /u
1964	Lev [33]	3 /u	0,6 /u

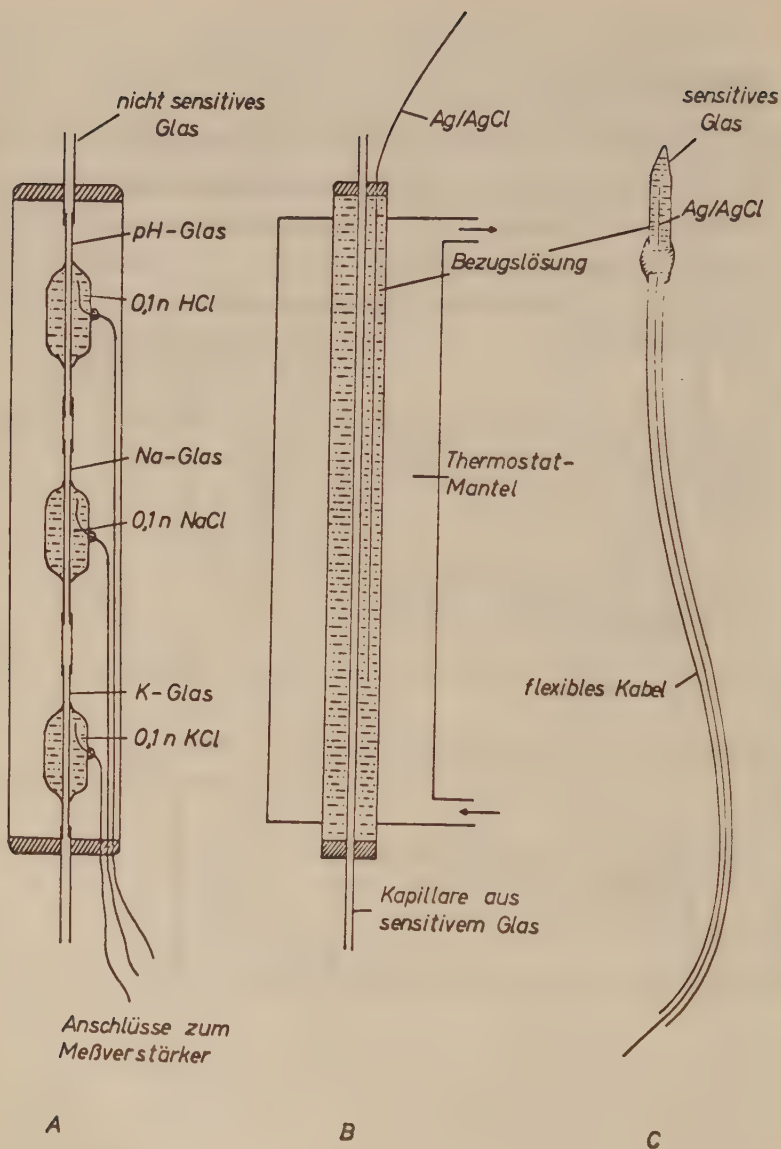
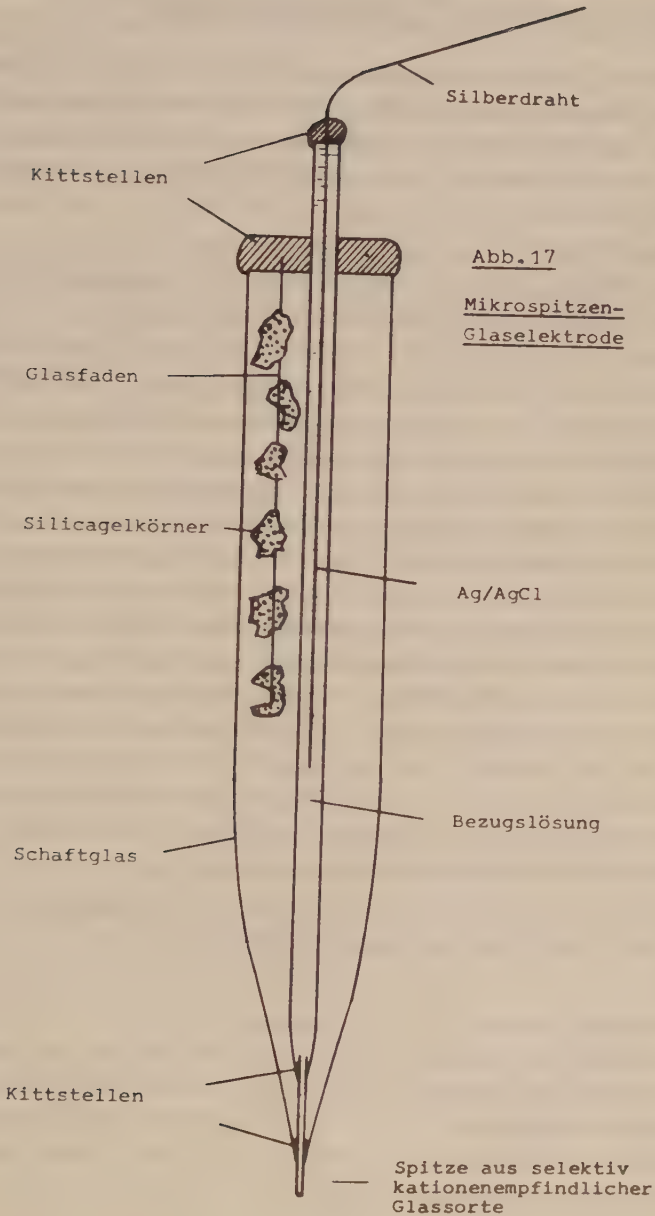


Abb. 16

Verschiedene Elektrodenformen



Ansprechgeschwindigkeit der Glaselektroden

Bei kontinuierlichen Messungen ist es wichtig zu wissen, ob die Glaselektrode zeitlich schnell erfolgende Änderungen in der Zusammensetzung des Meßgutes richtig wiederzugeben vermag, ob also ihr zeitliches Auflösungsvermögen hinreichend groß ist.

Mit der in Abb. 18 dargestellten Anordnung wurde dieser Frage nachgegangen. Zwei Vorratsbehälter enthielten Lösungen unterschiedlichen pH-Wertes. Eine Lösung war mit einem Farbstoff kräftig gefärbt. Über einen Zweiweghahn standen beide Behälter mit einem Rohr in Verbindung. Der empfindliche Teil der zu untersuchenden Glaselektroden ragte in dieses Rohr. An der Meßstelle konnte mit Photozellen oder Photowiderständen der jeweilige Färbungsgrad gemessen und mit Hilfe einer Eichkurve daraus der jeweils an der Glaselektrode herrschende pH-Wert bestimmt werden. Mit NaCl - Lösungen konnte entsprechend die Ansprechgeschwindigkeit der Na-Glaselektroden bestimmt werden. Saugte man am freien Ende der Kapillar-Elektroden kontinuierlich ab, so ließ sich mit dieser Anordnung auch bei Kapillar-Elektroden die Einstellzeit bestimmen. Photostrom und Ausgangsspannung des für diese Untersuchungen verwendeten, schnell arbeitenden Meßverstärkers (KEITHLEY 603) wurden einem Zweistrahl-Oszillographen zugeführt. Die Ansprechgeschwindigkeiten konnten so direkt abgelesen werden.

Es zeigte sich, daß eine große Zahl von Parametern die Einstellzeit der Glaselektroden beeinflusst:

- Dicke der sensitiven Membran
- Wässerungszustand der Glasmembran
- sensitive Glassorte
- Vorbehandlung der Glaselektrode
- Temperaturbereich
- Konzentrationsbereich
- Größe der Konzentrationsänderung

- Strömungsgeschwindigkeit der Lösung
- Eventuell vorhandene Verunreinigungen der Glasmembran

Das Zusammenspiel aller dieser Parameter ist kompliziert. Dies erklärt, warum die Verfasser von Arbeiten mit Mikro-Elektroden derart unterschiedliche Angaben über die Ansprechzeiten der Elektroden machen. So nennen z.B. KOSTYUK und SOROKINA [31] für pH-Spitzenelektroden Ansprechzeiten von 1 - 10 Sekunden, während KHURI [in 10] für eine ähnliche Elektrode eine Zeit von 5 Minuten nennt. RECHNITZ [42] fand als typische Werte der Ansprechzeiten von kationenempfindlichen Makro-Glaselektroden Zeiten zwischen 1,5 und 4,0 Sekunden.

Eine systematische Untersuchung der Zusammenhänge wäre über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen. Doch konnte das interessante Ergebnis gefunden werden, daß bei geringfügigen Änderungen in der Zusammensetzung der Meßflüssigkeit (etwa eine Zehntel pH-Einheit bzw. wenige mVal Na/l) kurz gewässerte, dünnwandige Glaselektroden nur etwa 0,1 - 0,2 Sekunden zur Ausbildung des konstanten neuen Endwertes der Elektrodenspannung brauchen. Dickwandige, lange gewässerte Glaselektroden benötigen dagegen bekanntlich für die Einstellung eines neuen Endwertes viele Minuten, teilweise sogar Stunden (ROENNEFAHRT [45]). Die Einstellzeit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mikro-Kapillar-Elektroden erwies sich somit als oft sehr viel schneller als diejenige der gesamten, sonst verwendeten Meßanordnung, da der meist benutzte Meßverstärker (KNICK 34) und Schreiber (PHILIPS PR 4069 M/04) zur Einstellung auf einen neuen Wert mehrere Sekunden benötigte.

Bedauerlicherweise stellen sich die Mikro-Spitzenelektroden, wie im letzten Kapitel erwähnt, meist sehr viel langsamer auf einen Endwert ein, obwohl gerade hier bei vielen kontinuierlichen Messungen eine hohe Ansprechgeschwindigkeit der Elektroden sehr erwünscht wäre.

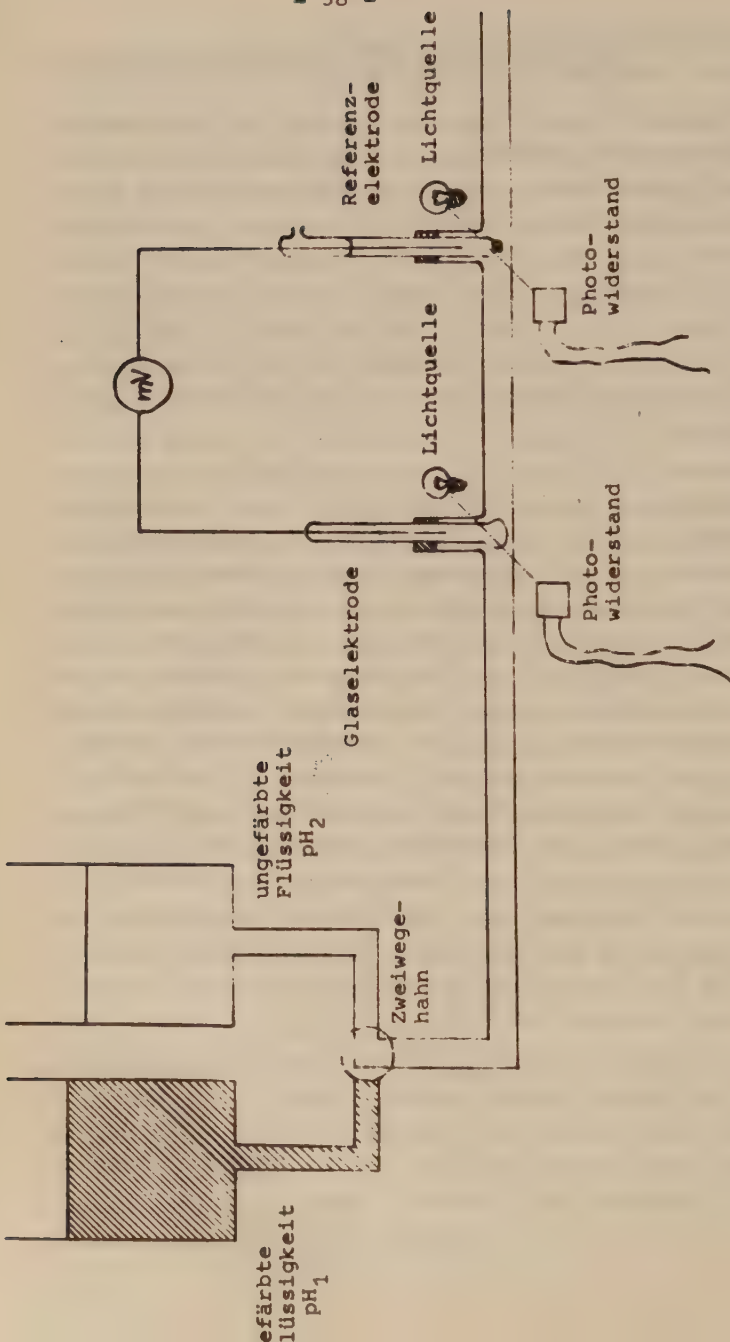


Abb. 18

Versuchsanordnung zur Bestimmung der

Ansprechgeschwindigkeit von Glaselektroden

Anwendungsbeispiele

Die hier beschriebenen Glaselektroden konnten bereits bei einigen Untersuchungen mit Erfolg verwendet werden:

1) J.SCHNERMANN, F.S.WRIGHT, J.M.DAVIS, W.F.v.STACKELBERG, G.GRILL, Regulation of superficial nephron filtration rate by tubulo-glomerular feedback, Pflüg. Arch., (1970), (im Druck)

Nach den Vorstellungen von K.THURAU [47a] ist das Glomerulumfiltrat einzelner Nephrene in Rattennieren von der Na-Konzentration im distalen Tubulus abhängig. Zur genaueren Analyse dieser Abhängigkeit wurden einzelne Henle'sche Schleifen vom letzten proximalen Segment her kontinuierlich durchströmt. Die Stromstärke wurde durch Mikropunktion distaler Segmente kontrolliert. Zur Messung des Glomerulumfiltrats der perfundierten Nephrene wurde die Tubulusflüssigkeit in frühproximalen Segmenten quantitativ entnommen und aus dem Anstieg der Inulinkonzentration und der tubulären Stromstärke das Filtrat berechnet. Die Natriumkonzentration in den distalen Punktaten wurde mit Na-Mikro-Kapillarelektroden der in Abb.1 gezeigten Art bestimmt. Damit war eine Korrelation der Na-Konzentration zum jeweils eingestellten Filtrat möglich.

Ein Profil der distalen Na-Konzentration in den drei experimentellen Gruppen (Ringer, Mannitol, Na-Sulfat) in Abhängigkeit von der Stromstärke zeigt die Abb.19. Die gleichzeitige Messung des Glomerulumfiltrats ergab bei Perfusion Henle'scher Schleifen mit Ringerlösung eine inverse Abhängigkeit des GFR von der Perfusionsstromstärke. Im Gegensatz dazu war sowohl in der Mannitol, als auch in der Sulfatgruppe das Glomerulumfiltrat von Änderungen der Schleifenstromstärke unabhängig. Diese Daten wurden so gedeutet, daß das Glomerulumfiltrat über einen Rückkopplungsmechanismus durch Änderungen der Zusammensetzung der distalen Tubulusflüssigkeit beeinflußt werden kann. Bei genauer Analyse der Ergebnisse scheint sich eine inverse Korrelation des Filtrats zur Menge des für die Zellmembranen permeationsfähigen Natriums zu ergeben.

2) P.DEETJEN, K.ZACH, W.F.v.STACKELBERG

Untersucht wurden Mikropunktionsproben, die zu Beginn des distalen Konvolutes der Rattenniere entnommen worden waren. Normalerweise findet sich fröhdistal eine niedrige Na-Konzentration ($< 40 \text{ mVal Na/l}$), welches die Folge der Na-Resorption im aufsteigenden dicken Teil der Henle'schen Schleife und der dort relativ geringen Wasserpermeabilität ist. Bei Funktionseinschränkung dieses Nephronteiles (z.B. unter der Wirkung von Diuretica) findet sich fröhdistal eine höhere Natrium-Konzentration. (Abb.20)

Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

3) H.v.BAYER, W.F.v.STACKELBERG

Die proximale Resorption in Abhängigkeit vom vorgegebenen pH-Wert gepufferter Perfusionslösungen sollte geprüft werden. Dabei mußte zunächst nachgewiesen werden, daß der pH-Wert der Perfusionslösung nach proximaler Passage tatsächlich unverändert ist. Die durchgeführten Messungen ergaben die Notwendigkeit, während des Versuches streng auf einen ausgewogenen Säure-Basen-Haushalt des Versuchstieres zu achten.

Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

4) R.LOEWE, B.LINZEN, W.F.v.STACKELBERG, Die gelösten Stoffe in der Hämolymphe einer Spinne, *Cupiennius salei* Keyserling, Z.vgl.Physiol., 66, 27 - 34, (1970)

Zur Bestimmung des pH-Wertes und der Na-Konzentration im Rahmen dieser speziellen Untersuchung wurde die in Abb.1 dargestellte Elektrodenform etwas variiert. Durch Einkitten des herausragenden Teils der Kapillare in eine angeschliffene Mikropunktionspitze konnten die zu untersuchenden Substanzen direkt mit der Glaselektrode unter Luftabschluß entnommen werden. Die gemessenen pH-Werte lagen zwischen 8,05 und 8,22, die Na-Konzentration konnte zu $223,0 \pm 29,8 \text{ mVal Na/l}$ bestimmt werden.

5) Bicarbonatkonzentration, CO_2 -Druck und pH-Wert in biologischen Flüssigkeiten hängen voneinander gemäß der Henderson-Hasselbalch'schen Gleichung ab. Sind zwei dieser Größen bekannt, so läßt sich die dritte berechnen. Abb.21 zeigt eine Anordnung, bei der durch Vorgabe eines bestimmten CO_2 -Druckes und Messung des jeweiligen pH-Wertes der Bicarbonatgehalt von Mikropunktionsproben bestimmt werden kann. Die hierzu angefertigte Anordnung ähnelt der von UHLICH et al. [49] verwendeten. Gemeinsam mit D.LEVINE und J.SCHNERMANN durchgeführte Versuche an Mikropunktionsproben bestätigten die zuverlässige Funktion einer solchen Anordnung. (unveröffentlicht)

6) Die Kenntnis des pH-Wertes im Blut von Versuchstieren gestattet Rückschlüsse auf den Beatmungszustand. Bei künstlicher Beatmung kleiner narkotisierter Versuchstiere ist es mit den im Handel befindlichen Glaselektroden auf Grund ihres relativ großen Bedarfes an Meßflüssigkeit nicht möglich, durch wiederholte Blutentnahme das Beatmungsoptimum über längere Zeit zu bestimmen. Mit Hilfe von selbstgefertigten pH-Kapillar-Elektroden im Mikroliterbereich war es möglich, die optimale künstliche Beatmung narkotisierter Ratten zu bestimmen. Die Untersuchungen wurden gemeinsam mit M.WAHL und W.KUSCHINSKY durchgeführt. (unveröffentlicht)

7) Die Natrium- und Kalium-Ausscheidung wird üblicherweise durch Untersuchung des vom Versuchstier abgegebenen Urins bestimmt. Sehr viel genauer ist es jedoch, Mikro-Elektroden der in Abb.16 A dargestellten Form (bzw. ausschließlich auf Natrium ansprechende derartige Elektroden) direkt an den Ureter eines Versuchstieres anzuschließen. Abb. zeigt die Na-Konzentration im Ureter einer Ratte zwischen 23 Uhr und 5 Uhr früh. Zusammen mit einem Tropfenzähler läßt sich so ein sehr präzises Bild der Natriumausscheidung gewinnen. Die gemeinsam mit F.WUNDERLICH durchgeführten Versuche dieser Art sollen demnächst fortgesetzt werden.

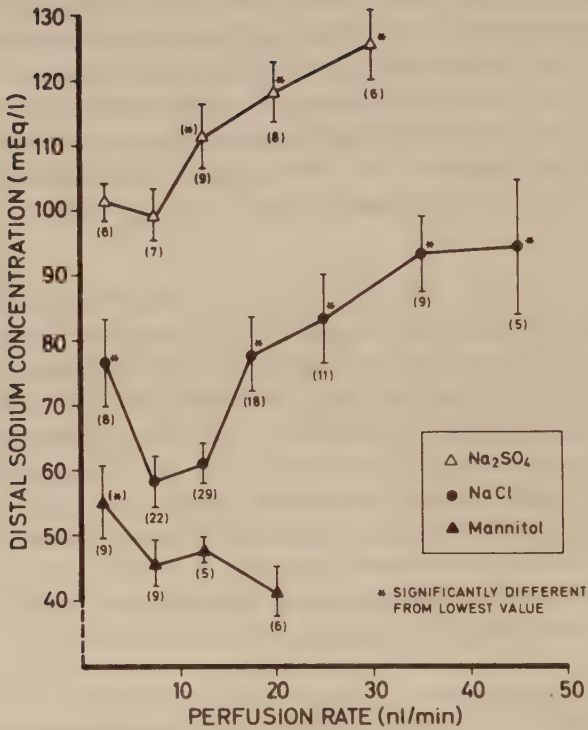


Abb. 19

Distale Natrium-Konzentrationen bei verschiedenen
Perfusionsstärken (Rattenniere)

TF/P_{Na} - fründistal

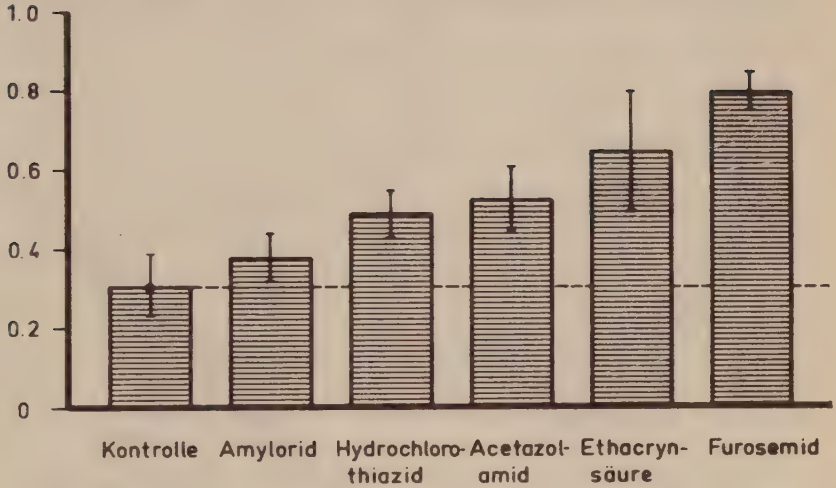


Abb. 20

TF / P_{Na}-fründistal unter dem Einfluß
von Diuretica (Rattenniere)

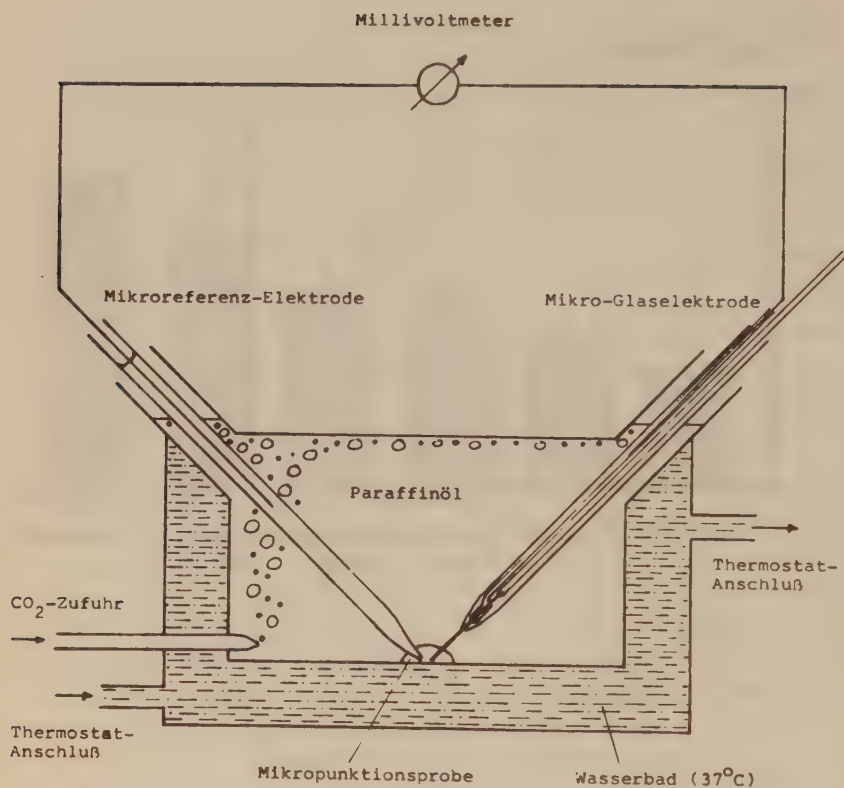


Abb.21

Versuchsanordnung zur Bestimmung der Bicarbonat-
konzentration in Mikropunktionsproben

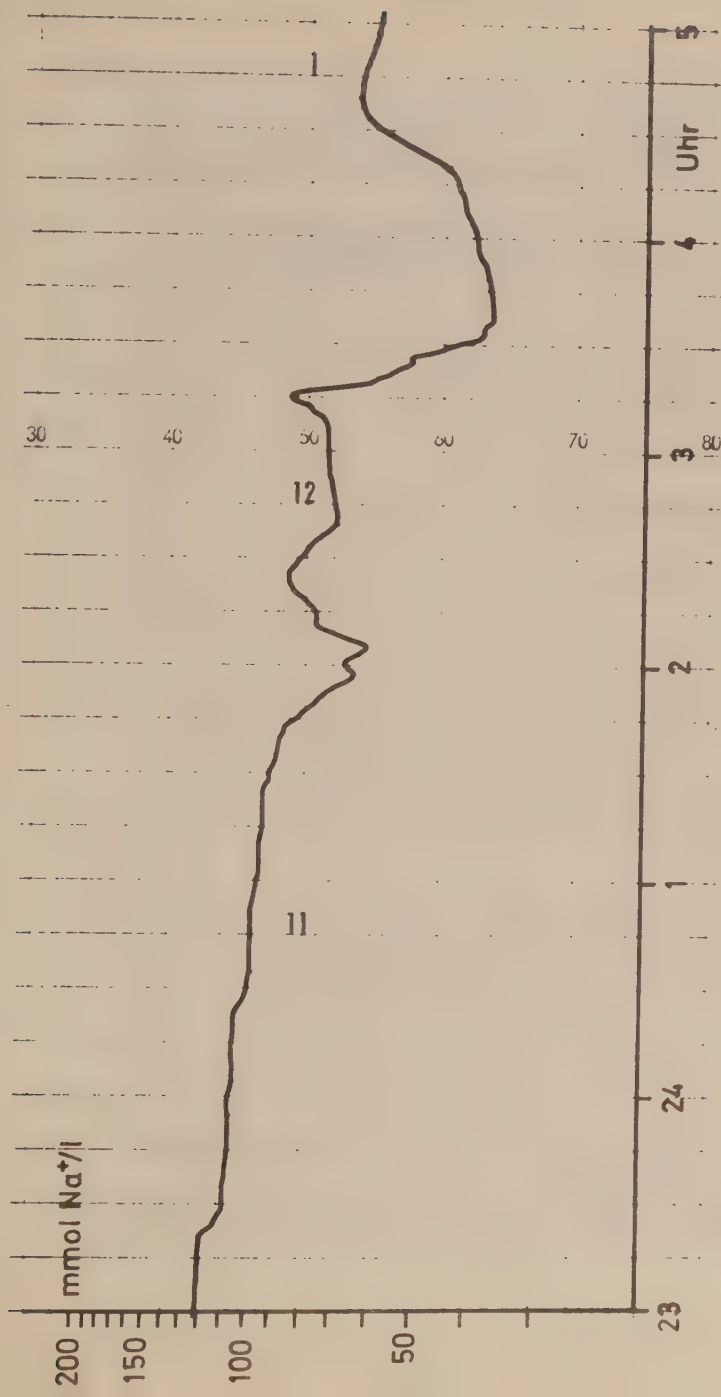


Abb. 22

Kontinuierliche Na^+ -Bestimmung im Ureter einer Ratte mit einer Na-Durchfluß-Elektrode

Literatur: ..

1. G.H.Ball, A stabile capillary glass electrode for measuring the pH of living tissue, *J.Lab.Clin.Med.*, 25, 992-995, (1940)
2. Beckman, Druckschrift: pH-Elektroden, München (1966)
3. P.C.Caldwell. An investigation of the intracellular pH of crab muscle fibres by means of micro-glass and micro-tungsten electrodes, *J.Physiol.* 126, 169-180, (1954)
4. P.C.Caldwell, Studies on the internal pH of large muscle and nerve Fibres, *J.Physiol.* 142, 22-62, (1958)
5. N.W.Carter, F.C.Rector, D.S.Campion, D.W.Seldin, Measurement of Intracellular pH of Skeletal Muscle with pH-sensitive Glass Microelectrodes, *J.Clin.Invest.*, 46, 920-933, (1967)
6. N.W.Carter, F.C.Rector, D.S.Campion, D.W.Seldin, Measurement of intracellular pH with glass microelectrodes, *Federations Proceedings*, 26, 1322-1326, (1967)
7. M.Cremer, Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von den polyphasischen Elektrolytketten, *Z.Biol.*, 47, 562 - 608, (1906)
8. H.Dutz, Eigenschaften einer selektiven Natrium-Elektrode, *Glastechn.Ber.*, 39, 139-140, (1966)
9. G.Eisenman, The Electrochemistry of Cation-Sensitive Glass Electrodes, in: *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, Vol.4, Edited by C.N.Reilly, New York, London, Sydney, (1965), 213-369
10. G.Eisenman, Glass electrodes for hydrogen and other cations. Principles and practice, London, New York (1967)
11. R.J.Fosbinder, J.Schoonover, An Improved Method of Measuring Glass Electrode Potentials, *J.Biol.Chem.*, 88, 605-614, (1930)
12. S.M.Friedman, J.D.Jamieson, M.Nakashima, C.L.Friedman, Sodium- and Potassium-Sensitive Glass Electrodes for Biological Use, *Science*, 130, 1252-1254, (1959)
13. S.M.Friedman, M.Nakashima, C.L.Friedman, Sodium, Potassium, and Peripheral Resistance in the Rat Tail, *Circulation Res.*, 13, 223, (1963)
14. S.M.Friedman, S.L.Wong, J.H.Walton, Glass electrode measurements of blood sodium, *J.Appl.Physiol.*, 18, 950, (1963)
15. R.Geyer, H.Frank, Eine Glaselektrode zur Indizierung der direkten Kaliumtitration mit Calciumtetraphenylborat, *Z.Anal.Chem.*, 179, 99-105, (1961)
16. F.Haber, Z.Klemensiewicz, Über elektrische Phasengrenzkraft, *Z.Physik.Chem. (Leipzig)*, 67, 385-431, (1909)

17. M.Hanns, M.de Heaulme, P.Morin, Utilisation d'une électrode de verre pour le dosage de l'ion sodium en solution, Bull.Soc.chim.France, 2658-2661, (1963)
18. J.A.M.Hinke, Glass Micro-Electrodes for Measuring Intracellular Activities of Sodium and Potassium, Nature, 184, 1257-1258, (1959)
19. J.A.M.Hinke, The measurement of sodium and potassium activities in the squid axon by means of cation-selective glass micro-electrodes, J.Physiol (London), 156, 314 - 335, (1961)
20. S.Hirakawa, H.Yoshimura, Measurements of the intracellular pH in a single cell of nitella flexilis by Means of Micro-Glass pH-Electrodes, The Jap.J.Physiol, 14, 45 - 55, (1964)
21. K.Horovitz, Der Ionenaustausch am Dielektrikum I, Die Elektrodenfunktion der Gläser, Z.Physik, 15, 369-398, (1923)
22. K.Horovitz, Über die Ausbildung von Mischelektroden an Phasengrenzen, Z.Physik.Chem. (Leipzig), 115, 424 - 432, (1925)
23. W.Ingold, Elektroden für die Potentiometrie und ihre Anwendungen in Laboratorium und Technik, Chimia (Zürich), 5, 196-203, (1951)
24. J.O.Isard, Alkali Ion Determinations by Means of Glass Electrodes, Nature, 184, 1616-1618, (1959)
25. K.Janáček, F.Morel, J.Bourguet, Etude expérimentale des potentiels électriques et des activités ioniques dans les cellules épithéliales de la vessie de Grenouille, J.de Physiologie, 60, 51-66, (1968)
26. R.N.Khuri, D.A.Goldstein, D.L.Maude, C.Edmonds, K.Solomon, Single proximal tubules of Necturus kidney; VIII: Na and K determination by glass electrodes, Am.J.Physiol., 204, 743-748, (1963)
27. R.N.Khuri, W.J.Flanigan, D.E.Oken, Potassium in proximal tubule fluid of rats and Necturus measured with glass electrodes, J.Appl.Physiol., 21, 1568-1572, (1966)
28. R.N.Khuri, S.K.Agulian, H.Oelert, R.I.Harik, A single Uni. pH Glass Ultramicro Electrode, Pflug.Arch., 294, 291-294, (1967)
29. R.N.Khuri, S.K.Agulian, R.I.Harik, Internal Capillary Glass Microelectrodes with a Glass Seal for pH, Sodium and Potassium, Pflug.Arch., 301, 182-186, (1968)
30. W.Kordatzki, Taschenbuch der praktischen pH-Messung, Verlag Müller und Steinicke, München (1949)
31. F.G.Kostyuk, Z.A.Sorokina, On the Mechanism of Hydrogen Ion Distribution between Cell Protoplasm and the Medium, in: Proceedings of a Symposium, Prag 1960, edited by A. Kleinzeller and A.Koty, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 193-203, (1961)

32. B.v.Lengyel, E.Blum, The Behaviour of the Glass Electrode in Connection with its chemical composition, *Trans.Faraday Soc.*, 30, 461-471, (1934)
33. A.A.Lev, Determination of Activity Coefficients of Potassium and Sodium Ions in Frog Muscle Fibres, *Nature*, 201, 1132-1134, (1964)
34. D.A.MacInnes, M.Dole, A Glass Electrode Apparatus for Measuring the pH values of very small volumes of solutions, *J.Gen.Physiol.*, 12, 805-811, (1929)
- 34a S.G.A.McLaughlin, J.A.M.Hinke, Sodium and Water Binding in Single Strated Muscle Fibers of the Giant Barnacle, *Can.J.Physiol.Pharmacol.*, 44, 837-848, (1966)
35. G.Mattock, R.Uncles, The Properties of Two Highly Selective Sodium Ion-responsive Electrode Glasses, *Analyst*, 87, 930-939 und 977, (1962)
36. G.Mattock, R.Uncles, The Response Properties of an Electrode Glass Sensitive to Potassium and Ammonium Ions, *Analyst*, 89, 350-356, (1964)
37. E.W.Moore, D.W.Wilson, The determination of sodium in body fluids by the glass electrode, *J.Clin.Invest.*, 42, 293-304, (1963)
38. E.W.Moore, J.W.Ross, Cationic Glass Electrode Response in Aqueous Solutions of Sodium Chloride and Potassium Chloride, *Science*, 148, 71-72, (1965)
39. D.M.Nutbourne, Measurement of Sodium Concentration in Physiological Solutions by Means of an Electrode Made from Glass B 104, *Anal.Biochem.*, 28, 326-335, (1969)
40. D.M.Nutbourne, Use of an Electrode Made from Glass BH 115 to Determine Potassium Concentration in Solutions Containing a Large Excess of Sodium, *Anal.Biochem.*, 28, 336-344, (1969)
41. K.Ohara, J.L.Newton, Ultramicro Glass Electrode for Sodium Analysis in Biological Fluids, *The Jap.J.Physiol.*, 18, 632-641, (1968)
- 41a H.D.Portnoy, L.M.Thomas, E.S.Gurdjian, Improved Electrodes for the continuous Measurement of Sodium and Potassium, *Talanta*, 9, 119-124, (1962)
42. G.A.Rechnitz, Response rates of cation-sensitive glass electrodes, *Talanta*, 11, 1467-1468, (1964)
43. F.C.Rector jr., N.W.Carter, D.W.Seldin, The Mechanism of Bicarbonate Reabsorption in the Proximal and Distal Tubules of the Kidney, *J.Clin.Invest.*, 44, 278-290, (1965)
44. J.W.Ritter, Neue Versuche über den Galvanismus, Kaiserlich privilegirter Reichs-Anzeiger, 813-820, (1802)
45. K.W.Roennefahrt, Fortschritte der Glaselektroden-Meßtechnik und Potentiometrie, *Chemie für Labor und Betrieb*, 17, 488-494, (1966)

46. W.Schmidt-Kessen, Fortlaufende Registrierung der intra-gastralen Azidität mit Glaselektroden, Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Greifswald, 1, 219-228, (1951/52)
47. K.Schwabe, pH-Meßtechnik, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig, (1963)
- 47a K.Thurau, Influence of Sodium Concentration at Macula Densa on Tubular Sodium Load, Annals of the New York Academy of Sciences, 139, Article 2, 388-399, (1966)
48. A.H.Truesdell, Activity Coefficients of Aqueous Sodium Chloride from 15 ° to 50 °C measured with a Glass Electrode, Science, 161, 884-886, (1968)
49. E.Uhlich, C.A.Baldamus, K.J.Ullrich, Verhalten von CO₂-Druck und Bicarbonat im Gegenstrom des Nierenmarks, Pflüg.Arch., 303, 31-48, (1968)
50. C.Voegtlin, H.Kahler, R.H.Fitch, Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration der Gewebe bei lebenden Tieren mit Hilfe der Kapillarglaselektrode, in: E.Abderhalden, Handbuch biol. Arbeitsmethoden, Abt.V, Teil 10, I, 667-684, (1938)
51. L.N.Vorobiev, Potassium Ion Activity in the Cytoplasm and the Vacuole Cells of Chara and Griffithsia, Nature, 216, 1325-1327, (1967)
52. L.N.Vorobiev, Potassium Selective Microelectrodes with Precipitate in the Tip, Nature, 217, 450-451, (1968)
53. Youden, Dobrosky, Contrib. Boyce Thompson Inst., 2, 347, (1931).

Lebenslauf

Am 9.9.1939 wurde ich in Stahnsdorf/Teltow geboren. Von den sechs Söhnen meiner Eltern, des Meteorologen Arend Frhr.v.Stackelberg und seiner Ehefrau Maria geb. Küttner, bin ich der zweitälteste.

Im Frühjahr 1959 bestand ich das Abitur am humanistischen Spohngymnasium in Ravensburg/Württemberg. Im Sommersemester 1959 begann ich mit meinem Physikstudium an der Universität Hamburg. Seit dem Wintersemester 1959/60 studiere ich an der Universität München.

Neben dem üblichen Studiengang absolvierte ich ein halbjähriges Praktikum in geophysikalischen Meßmethoden am Erd- und Grundbauinstitut Hamburg, ferner ein Praktikum in experimenteller Neutronenphysik am EURATOM - Kernforschungszentrum in Ispra/Italien.

Die Entwicklung eines hochempfindlichen Ultraviolett-Photonenzählers war Inhalt meiner Diplomarbeit, die ich von 1964 - 1967 bei Prof. Müller an der Deutschen Versuchsanstalt für Luft- und Raumfahrt in München - Riem durchführte. Im Mai 1967 legte ich die Diplom - Hauptprüfung in Experimentalphysik mit dem Gesamtergebnis „gut“ ab.

Seit dem Sommersemester 1967 studiere ich Zoologie an der Universität München und bin wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut.

Ich bin verheiratet mit Barbara geb. v.Uslar-Gleichen. Wir haben drei Kinder.

Für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und das entgegengebrachte Interesse möchte ich Herrn Prof. Dr. H. AUTRUM meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. K. THURAU bin ich für die Anleitung der Arbeit, für großzügige Gewährung der erforderlichen Mittel und zahlreiche fördernde Diskussionen ebenfalls sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. GALSTER von der Firma INGOLD in Frankfurt und Herrn Dr. DUTZ von der Firma JENA^{er} GLASWERK SCHOTT und GEN. in Mainz danke ich für technische Hinweise und für freundliche Zusendung einiger Kationen-sensitiver Glasproben.

